

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

CÍNTIA RABELO E PAIVA CARIA

**REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO DURANTE CICLOS
DE PERDA E REGANHO DE PESO EM CAMUNDONGOS**

Bragança Paulista
2017

CÍNTIA RABELO E PAIVA CARIA – 001201302046

**REMODELAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO DURANTE CICLOS
DE PERDA E REGANHO DE PESO EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Alessandra Gambero

Bragança Paulista
2017

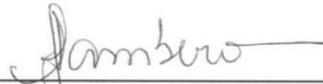
WD 210 C275r Caria, Cíntia Rabelo e Paiva.
Remodelamento do tecido adiposo durante os ciclos de perda e ganho de peso / Cíntia Rabelo e Paiva Caria. – Bragança Paulista, 2017.
90 p.

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

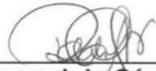
Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Tecido adiposo. 2. Matriz extracelular. 3. Inibidor de metaloproteinase de matriz. 4. Metaloproteinases de matriz. 5. Cromoglicato de sódio. I. Gambero, Alessandra. II. Título.

CARIA, P. R., Cíntia, “Remodelamento do Tecido Adiposo durante Ciclos de Perda e Reganho de Peso em Camundongos” Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 24 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



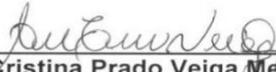
Profa. Dra. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello
Universidade Estadual de Campinas



Profa. Dra. Uliana Sbeguen Stotzer
Universidade Federal de São Carlos

“Ao meu esposo Muller, pelo companheirismo e amor a mim dedicado.”

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram diretamente com a execução deste trabalho ou que estiveram presentes em minha vida, me apoiando e acreditando em meus projetos.

De forma especial, agradeço:

A professora Alessandra, pela orientação durante esses 6 anos (desde o Mestrado). Seus ensinamentos, conselhos, confiança e sua amizade foram essenciais na construção deste trabalho e me fizeram acreditar em mim mesma.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e funcionários da Universidade São Francisco, pelas contribuições e convívio.

Aos professores que contribuíram para o exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa deste trabalho.

A todos os colegas de bancada, com vocês aprendi e ensinei muitas técnicas, mas também aprendi que esta jornada é feita de desafios, construção e amadurecimento.

As minhas também colegas de bancada, mas que se tornaram grandes amigas, Carol, Eloá, Érica, Paola, Patrícia, Simone e Tanila. Obrigada pela convivência, pela força e pelo carinho.

A Thainá, aluna de iniciação científica sob minha orientação. Obrigada pelo apoio em todas as vezes que precisei e, principalmente, pela sua dedicação e interesse no seu projeto, o que me permitiu amadurecer quanto pesquisadora.

Aos novos membros, Caio, Reginaldo e Lígia, os quais tive oportunidade de conhecer e auxiliar de várias maneiras na execução inicial de seus projetos.

A Vânia, Débora e Joelise, alunas da Unicamp. Foi um prazer conviver e poder contribuir com o trabalho de vocês.

A Jazmin, intercambista de medicina do Peru, pela oportunidade de treinar meu inglês, mostrando um pouquinho do meu trabalho no laboratório e pela troca de experiência cultural.

Ao professor David e seus alunos, por terem me recebido de braços abertos na Universidade de Guelph, Canadá.

Aos meus pais, Santana e Eosman, e ao meu esposo, Muller, que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas. Obrigada pela compreensão, paciência e amor.

A toda minha família e amigos que contribuem na evolução do meu “eu” interior.

A Universidade São Francisco, ao departamento da UNIFAG e ao Biotério.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E a Deus, minha fortaleza.

“Se tiverdes fé, nada vos será impossível.”

Mateus 17:20

RESUMO

A perda de peso por indivíduos obesos seguida de ganho de peso ou simplesmente o “efeito sanfona” contribui para disfunções metabólicas e inflamatórias, além de interferir com o remodelamento do tecido adiposo (TA). Este trabalho objetivou caracterizar o modelo experimental de ciclos de perda/ganho de peso (CPRP) em camundongos e avaliar os efeitos da estabilização de mastócitos e da inativação de metaloproteinases (MMPs) sobre as alterações de matriz extracelular e inflamação no TA, bem como as alterações metabólicas sistêmicas durante CPRP. Camundongos Swiss foram alimentados com dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas, submetidos ou não à perda de peso com restrição calórica por 8 semanas (RC) e, reintroduzidos em DH por 8 semanas para o ganho de peso (RC/RDH). O tratamento com cromoglicato de sódio, um estabilizador de mastócitos (CG) (25mg/kg/dia; via i.p.) foi realizado durante a perda e ganho de peso (RC+CG; RC/RDH+CG) ou com GM6001, um inibidor não específico de MMPs (100mg/kg/dia; via i.p.) foi realizado durante a perda de peso (RC+GM). Peso corporal, adiposidade, parâmetros metabólicos foram avaliados. Biópsias de TA foram empregadas na avaliação de citocinas e do infiltrado de leucócitos. Metaloproteinases de matriz foram quantificadas e sua atividade avaliada por Zimografia. O tamanho dos adipócitos foi avaliado bem como a presença de fibrose foi avaliada por Picro-Sirius Red. A RC melhorou parcialmente a resistência à insulina, lipidemia e a inflamação, mas a atividade das MMPs estava aumentada no TA. Após RC/RDH as alterações metabólicas e inflamatórias estavam semelhantes ao DH. A estabilização de mastócitos com CG após RC/RDH resultou em alterações no infiltrado de leucócitos e macrófagos no TA visceral, mas não no perfil de MMPs, citocinas inflamatórias ou nos parâmetros metabólicos. Já a inativação das MMPs após RC/RDH foi capaz de melhorar a resistência à insulina e lipidemia, aumentar adiponectina e IL-10, reduzir IL-6, TNF- α e MMP-12, além de interferir com o tamanho dos adipócitos e reduzir a fibrose, sem alterar o infiltrado de leucócitos e macrófagos no TA. Desta forma, podemos concluir que mastócitos participam da modulação da migração de macrófagos no TA durante os CPRP. A atividade das MMPs é mais intensa na perda do que no ganho de peso e pode estar relacionada à atividade inflamatória. E a inibição das MMPs interfere no tamanho dos adipócitos e na inflamação no TA durante o ganho de peso, resultando em melhora nos parâmetros metabólicos associados aos CPRP.

Palavras-chave: TECIDO ADIPOSEO. MATRIZ EXTRACELULAR. METALOPROTEINASES DE MATRIZ. CROMOGLICATO DE SÓDIO. INIBIDOR DE METALOPROTEINASE DE MATRIZ.

ABSTRACT

Weight loss by obese individuals followed by weight regain or "weight cycling" contributes to metabolic and inflammatory dysfunctions, as well as to interfere with white adipose tissue (WAT) remodeling. This study aimed to characterize the experimental model of weight cycling (WC) in mice and to evaluate the effects of mast cell stabilization and inactivation of metalloproteinases (MMPs) on extracellular matrix changes and inflammation in WAT, as well as systemic metabolic changes during WC. Swiss mice were fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks and underwent or not to caloric restriction for 8 weeks, resulting in weight loss (WL). After, they were reintroduced in HFD for 8 weeks for weight regain (WLWR). Treatment with sodium cromoglycate, a mast cell stabilizer (CG) (25 mg/kg/day, via ip) was performed during weight loss and weight regain (WL + CG, WLWR + CG) or with GM6001, a non-specific matrix metalloproteinases inhibitor (100 mg/kg/day; ip) was performed during weight loss (WL + GM). Body weight, adiposity, metabolic parameters were evaluated. Adipokines and leukocyte infiltration were assessed in WAT biopsies. Matrix metalloproteinases were quantified and their activity was evaluated by Zymography assay. Adipocyte size were measured and the fibrosis evaluated by Picro-Sirius Red. WL partially improved insulin resistance, lipidemia, and inflammation, but MMP activity was increased in WAT. After WLWR, metabolic and inflammatory changes were similar to HFD. Stabilization of mast cells with GC after WLWR resulted in changes in leukocyte and macrophages infiltration in visceral WAT, but not in the profile of MMPs, inflammatory cytokines or metabolic parameters. On the other hand, the inactivation of MMPs after WLWR was able to improve insulin resistance and lipidemia, increase adiponectin and IL-10, reduce MMP-12, TNF- α and IL-6, besides interfering with adipocyte size and reducing fibrosis, without altering the leukocyte and macrophage infiltration in the WAT. In this way, we can conclude that mast cells participate in the modulation of the macrophage migration in WAT during WLWR. The activity of the MMPs is intense during the weight loss period and can be related to the inflammatory activity. The inhibition of MMPs interferes with adipocyte size and inflammation in WAT during weight regain, resulting in improved metabolic parameters associated with WC.

Keywords: WEIGHT CYCLING, ADIPOSE TISSUE, EXTRACELLULAR MATRIX, MATRIX METALLOPROTEINASES, CROMOLYN SODIUM, MATRIX METALLOPROTEINASES INHIBITOR.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs: Desintegrina e metaloproteínas

AgRP: Proteína relacionada ao gene Agouti

ALT: Alanina aminotransferase

ANOVA: Análise de variância

CART: Transcritos relacionados à anfetamina e cocaína

CCL18: Ligante 18 de quimiona CC

CCR2: Receptor da MCP-1

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório

C/EBP α : Proteína de ligação estimuladora α

CEUA: Comitê de ética no uso de animal em pesquisa

CP-544439: Inibidor específico de MMP-13

EE: *Energy expenditure* ou gasto energético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay = ensaio de imunoadsorção ligado a enzima

EPM: Erro padrão da média

HDL: Lipoproteína de alta densidade

G-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos

GRO α : Oncogene α

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase

IFN- γ : Interferon- γ

IL: Interleucina

ITT: Teste de tolerância à insulina

kITT: Constante do teste de tolerância à insulina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

M1: Macrófago do fenótipo tipo 1

M2: Macrófago do fenótipo tipo 2

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1

MCP-6: Protease de mastócito-6

MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófagos 1 α

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MT-MMP: Metaloproteinase transmembrana

NKT: Célula *Natural Killer T*

NPY: Neuropeptídeo Y

PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio

PBS: *Phosphate buffered saline*

PDGFR: Resíduos de tirosina no receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PPAR- γ : Receptor do ativador por proliferadores de peroxissoma γ

POMC: Pró-ópio-melanocortina

RO 28-2653: Inibidor de MMPs

SVF: Fração estromal vascular

TGF- β : Fator transformador de crescimento β

Th1: Linfócitos T (*helper 1*)

Th2: Linfócitos T (*helper 2*)

TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

tPA: Ativador do plasminogênio tecidual

uPA: Ativador do plasminogênio uroquinase

USF: Universidade São Francisco

LISTA DE DENOMINAÇÕES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

CG: Cromoglicato de sódio (estabilizador de mastócitos)

DH: grupo obeso

DP: grupo controle

GM6001: Galardin (inibidor de MMPs)

RC: grupo restrição calórica

RC+CG: grupo restrição calórica tratado com cromoglicato de sódio

RC+GM: grupo restrição calórica tratado com GM6001

RC/RDH: grupo ganho de peso

RC/RDH+CG: grupo ganho de peso tratado com cromoglicato de sódio

RC+GM/RDH: grupo ganho de peso tratado com GM6001

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição de macronutrientes da dieta padrão (AIN-93M) e dieta hiperlipídica.....	34
TABELA 2. Marcação celular para análise por citometria do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo epididimal.....	37
TABELA 3. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio.....	47
TABELA 4. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio.....	48
TABELA 5. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio.....	49
TABELA 6. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG).....	51
TABELA 7. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG).....	52
TABELA 8. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo dos animais mantidos em dieta controle (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG).....	53

TABELA 9. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001.....	55
TABELA 10. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001.....	57
TABELA 11. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001.....	61
TABELA 12. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	63
TABELA 13. Expressão proteica de MMPs no tecido adiposo epididimal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	65
TABELA 14. Contagem de células na fração estromal vascular expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática da organização dos domínios de MMPs, ADAMs e ADAM-TS.....	23
FIGURA 2: Interação entre MMP/TIMP.....	24
FIGURA 3. Grupos e tempos experimentais.....	33
FIGURA 4. Esquema do tratamento com cromoglicato durante os protocolos de 16 e 24 semanas.....	35
FIGURA 5. Esquema do tratamento com GM6001 durante os protocolos de 16 e 24 semanas.....	35
FIGURA 6. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP) e em dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas.....	41
FIGURA 7. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais mantidos em dieta padrão (DP) e mantidos em dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas.....	41
FIGURA 8. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica (RC).....	42
FIGURA 9. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal (TAE), subcutâneo (TAS), perirenal (TAP), mesentérico (TAM) e fígado (FÍG) dos animais DP, DH e RC.	43
FIGURA 10. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais DP, DH e RC.....	43
FIGURA 11. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos à restrição calória e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH).....	44
FIGURA 12. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal (TAE), subcutâneo (TAS), perirenal (TAP), mesentérico (TAM) e fígado (FÍG) dos animais DP, DH e RDH.....	45
FIGURA 13. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais DP, DH e RC/RDH.....	45

FIGURA 14. Peso corporal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio.....	46
FIGURA 15. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG).....	50
FIGURA 16. Peso corporal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM 6001 (RC+GM).....	54
FIGURA 17. Detecção da atividade gelatinolítica no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001...	56
FIGURA 18. Expressão de componentes da matriz extracelular por Western Blot (colágeno I, colágeno IV, fibronectina e Laminina) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001...	58
FIGURA 19. Quantificação de colágeno total (I e III) pela técnica de Sirius Red no tecido adiposo epididimal nos animais mantidos em dieta padrão (A), em dieta hiperlipídica (B) e submetidos a restrição calórica com (D) ou sem (C) tratamento simultâneo com GM6001. Análise quantitativa de fibrose nos diferentes grupos experimentais (E).....	59
FIGURA 20. Distribuição dos adipócitos com diferentes áreas no tecido adiposo epididimal de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001.....	60
FIGURA 21. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com GM6001 durante a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	62
FIGURA 22. Detecção da atividade gelatinolítica no tecido adiposo epididimal de	

animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	64
FIGURA 23. Quantificação de colágeno total (I e III) pela técnica de Sirius Red no tecido adiposo epididimal nos animais mantidos em dieta padrão (A), em dieta hiperlipídica (B) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (C) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (D). Análise quantitativa de fibrose nos diferentes grupos experimentais (E).....	66
FIGURA 24. Distribuição dos adipócitos com diferentes áreas no tecido adiposo epididimal de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH).....	67
FIGURA 25: Ação do cromoglicato de sódio e do GM6001 sobre as alterações metabólicas, inflamatórias e no perfil de MMPs durante os ciclos de perda e reganho de peso.....	80

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
1.1.	Obesidade, “efeito sanfona” e remodelamento tecidual.....	20
1.2.	Mastócitos e remodelamento tecidual.....	27
1.3.	MMPs e remodelamento tecidual.....	28
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1.	Objetivo Geral.....	31
2.2.	Objetivos Específicos.....	31
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1.	Modelo de obesidade – Animais.....	32
3.2.	Protocolos experimentais de ciclos de peso.....	32
3.3.	Tratamento dos animais com cromoglicato ou GM6001.....	34
3.4.	Glicemia basal e teste de tolerância à insulina (ITT).....	36
3.5.	Análise do gasto energético.....	36
3.6.	Eutanásia dos animais e coleta de materiais.....	36
3.7.	Obtenção e análise da fração estromal vascular a partir do tecido adiposo epididimal.....	37
3.8.	Extração de proteína e determinação da produção de citocinas, adipocinas e MMPs no tecido adiposo epididimal.....	37
3.9.	Determinação dos níveis séricos de insulina, HDL e LDL sérica.....	38
3.10.	Avaliação da atividade das MMPs.....	38
3.11.	Análise dos componentes da matriz extracelular por Western Blot.....	38
3.12.	Análise histológica do tecido adiposo.....	39
3.13.	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS.....	40

4.1. Caracterização do modelo experimental: ciclo de perda e reganho de peso em camundongos (Parte I).....	40
4.1.1. Estabelecimento da obesidade.....	40
4.1.2. Ciclo de perda de peso.....	42
4.1.2.1. Parâmetros antropométricos e metabólicos.....	42
4.1.3. Ciclo de reganho de peso.....	44
4.1.3.1. Parâmetros antropométricos e metabólicos.....	44
4.2. Efeitos do tratamento com CG durante os ciclos de perda e reganho de peso (Parte II).....	46
4.2.1. Ciclo de perda de peso.....	46
4.2.1.1. Parâmetros antropométricos e metabólicos.....	46
4.2.1.2. Avaliação da infiltração de células e da produção de adipocinas/citocinas no tecido adiposo epididimal.....	48
4.2.1.3. Avaliação da produção de MMPs no tecido adiposo epididimal.....	49
4.2.2. Ciclo de reganho de peso.....	50
4.2.2.1. Parâmetros antropométricos e metabólicos.....	50
4.2.2.2. Avaliação da infiltração de células e da produção de adipocinas/citocinas no tecido adiposo.....	52
4.2.2.3. Avaliação da produção de MMPs no tecido adiposo.....	53
4.3. Efeitos do tratamento com GM6001 durante os ciclos de perda e reganho de peso.....	54
4.3.1. Ciclo de perda de peso.....	54
4.3.1.1. Parâmetros metabólicos e antropométricos.....	54
4.3.1.2. Atividade e expressão de MMPs no tecido adiposo.....	56
4.3.1.3. Avaliação dos componentes da matriz extracelular.....	58
4.3.1.4. Avaliação do tamanho dos adipócitos.....	60
4.3.1.5. Avaliação do infiltrado inflamatório no tecido adiposo.....	61

4.3.2.	Ciclo de reganho de peso.....	62
4.3.2.1.	Parâmetros metabólicos e antropométricos.....	62
4.3.2.2.	Atividade de expressão de MMPs no tecido adiposo.....	64
4.3.2.3.	Quatificação de colágeno total no tecido adiposo.....	66
4.3.2.4.	Avaliação do tamanho dos adipócitos.....	67
4.3.2.5.	Avaliação do infiltrado inflamatório no tecido adiposo.....	68
5.	DISCUSSÃO.....	69
6.	CONCLUSÃO.....	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8.	ANEXO.....	90
8.1	Aprovação Comitê de Ética.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade, “efeito sanfona” e remodelamento tecidual

A obesidade é definida como uma doença caracterizada pela expansão excessiva do tecido adiposo e que pode estar associada ao estabelecimento de uma inflamação sistêmica e crônica de baixo grau. Está implicada no desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares (BOUTENS; STIENSTRA, 2016), bem como no desenvolvimento de fibrose no tecido adiposo (CHABOT et al., 2016).

Dietas restritivas que levam a perda de peso têm sido utilizadas por indivíduos obesos, apesar do limitado sucesso a longo prazo (KROEGER; HODDY; VARADY, 2014; OCHNER et al., 2013). As dietas restritivas geralmente resultam em períodos de perda de peso seguidos de períodos de reganho, um fenômeno conhecido como “efeito sanfona” ou “weight cycling” (BLACKBURN et al., 1989). A cirurgia bariátrica tem se mostrado efetiva na redução do peso em pacientes com obesidade grau 3, das co-morbidades associadas a obesidade, bem como no aumento da expectativa de vida. No entanto, uma parcela significativa (estimada em 10-20%) volta a ganhar peso após a cirurgia (KARMALI et al., 2013). Dentre os motivos que levam pacientes a recidivarem após a cirurgia bariátrica podemos citar os de ordem psiquiátrica, a falta de atividade física, alterações endócrinas/metabólicas como o aumento dos níveis de grelina, não adesão às dietas além de motivos relacionados a falhas cirúrgicas (KARMALI et al., 2013).

A celularidade do tecido adiposo está entre os fatores que podem contribuir para o reganho de peso que se segue da perda de peso induzida por dietas restritivas (OCHNER et al., 2013). A expansão inicial do tecido adiposo é resultante do aumento do seu tamanho (hipertrofia), seguido pelo aumento do número de adipócitos a partir de células precursoras (hiperplasia) governado pelo processo de adipogênese, que reflete o balanço entre lipólise e lipogênese. Indivíduos com hipertrofia no tecido adiposo, quando comparados aos indivíduos com hiperplasia mas que possuem o mesmo índice de massa corporal e adiposidade, apresentam insulina de jejum mais alta e resistência periférica à insulina (ERIKSSON-HOGLING et al., 2015). Com a perda de peso, a redução do tamanho dos adipócitos resulta em um ganho maior em termos de redução da insulinemia e da melhora da sensibilidade à insulina (ERIKSSON-HOGLING et al., 2015), porém, durante a perda de peso ocorre uma redução significativa na hipertrofia dos adipócitos, a hiperplasia permanece provavelmente pela falta de uma programação adequada para a morte celular (OCHNER et al., 2013). Embora estudos mais antigos sugiram que adipócitos menores possam facilitar o reganho de peso, não há um

consenso sobre este tópico (OCHNER et al., 2013). Durante o reganho de peso, os adipócitos oferecem alta flexibilidade no armazenamento de energia, facilitando a recarga e o armazenamento de energia ingerida (MACLEAN et al., 2015).

Os estoques de tecido adiposo estão localizados em regiões distintas e também apresentam funções específicas dependendo da condição em que se encontram, e desta forma, podem ser classificados em tecido adiposo branco (visceral e subcutâneo) e tecido adiposo marrom. O tecido adiposo branco possui capacidade de armazenar o excesso de lipídeos em até 90% de seu volume total em uma única gota citoplasmática de gordura unilocular, sendo essencial para períodos de jejum (AZHAR et al., 2016). No entanto, durante o estabelecimento da obesidade, o armazenamento excessivo de energia ingerida pelos adipócitos é acompanhado pelo aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias e, conseqüentemente pelo recrutamento e infiltração de células imunológicas, tais como monócitos/macrófagos, linfócitos e células dendríticas para o tecido adiposo branco (KANG et al., 2016; LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017), gerando um nível moderado de inflamação local e sistêmica, que influencia no comportamento das vias metabólicas (AZHAR et al., 2016). Já o tecido adiposo marrom, apresenta várias pequenas gotículas lipídicas multiloculares localizadas no citoplasma e a presença de muitas mitocôndrias, sendo capaz de catabolizar rapidamente grandes quantidades de ácidos graxos, apresentando atividade termogênica. As perturbações na atividade do tecido adiposo marrom, como a dissipação de energia, também contribuem para condução do estado obeso (AZHAR et al., 2016). Estudos recentes têm identificado um tecido adiposo branco intermediário, ou seja, quando este é estimulado pela necessidade de gerar calor, pela prática de exercícios físicos ou pela ação de agentes termogênicos, apresenta a capacidade de conversão de tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom, processo chamado de “*browning*”, também conhecido como tecido adiposo bege (AZHAR et al., 2016; FU et al., 2016).

Em resposta as alterações no número e/ou tamanho dos adipócitos, além da tensão mecânica imposta aos adipócitos, o tecido adiposo é rapidamente e dinamicamente remodelado durante sua expansão e regressão (CHOE et al., 2016). Este remodelamento é caracterizado pela superprodução dos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina (SUGANAMI; OGAWA, 2010), e se faz importante na modulação de vários processos biológicos, incluindo a adipogênese, a migração e reparação celular (WILLIAMS; KANG; WASSERMAN, 2015). A matriz extracelular pode ser dividida em componentes fibrilares, componentes não fibrilares e microfibrilas que são secretados localmente e formam

uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que os produz (ALBERTS et al., 2006). Além de sua função estrutural, a matriz extracelular também apresenta função instrucional como já citado, afetando a diferenciação e função celular, também atua como um reservatório de fatores de crescimento (HUANG; GREENSPAN, 2012).

Os colágenos são os componentes estruturais mais abundantes da matriz extracelular, não só suportam a arquitetura dos tecidos, mas também as funções celulares, incluindo a adesão celular, a migração, a diferenciação, a morfogênese e a cicatrização de feridas (LIN; CHUN; KANG, 2016). Existem mais de 24 tipos de colágenos conhecidos, os colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V e XI) os que apresentam cadeias denominadas α que se associam de tal forma a constituírem uma tripla hélice, sendo que suas extremidades não assumem a configuração helicoidal e favorecem a interação entre os colágenos e outros elementos que compõem a matriz extracelular. O colágeno não fibrilar (tipo IV), reúne-se em uma rede plana e é o principal componente de todas as lâminas basais maduras. Outros componentes como a elastina por exemplo, formam uma extensa rede entrelaçada de fibras e camadas e, podem ser estendidas e retraídas, concedendo elasticidade à matriz. Já a fibronectina e a laminina são glicoproteínas de matriz com múltiplos domínios que permitem a aderência da célula a matriz (ALBERTS et al., 2006). A interação fisiológica entre os adipócitos e as diversas proteínas que compõem a matriz extracelular estão associados as consequências metabólicas da obesidade. O excesso de deposição de colágenos causa dano tecidual crônico sob condições patológicas e é definido como uma condição fibrótica. Ao contrário da existência de fibrose na pele, pulmões, fígado ou rins, a fibrose no tecido adiposo ainda não está totalmente elucidada, mas está associada à infiltração de células inflamatórias no tecido lesionado, apresentando assim, impacto patológico sobre o metabolismo durante o estabelecimento da obesidade (CHUN, 2012).

Durante os processos de expansão e regressão do tecido adiposo, alterações de celularidade e de matriz extracelular são contínuos e necessários para manutenção do tecido (DRANSE et al., 2016; LEE; WU; FRIED, 2010). Este remodelamento é mediado pelos sistemas fibrinolítico plasminogênio e plasmina, pelas metaloproteinases de matriz (MMPs), desintegrina e metaloproteinases (ADAMs) e pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). As MMPs são sintetizadas como pro-enzimas ou zimogênios, estruturalmente compostas de um prodomínio NH₂-terminal e um domínio catalítico contendo um sítio de ligação Zn²⁺, ligado a três resíduos de histidina na sequência AH₆EXGHXXGXXH. Para que se tornem ativas, se faz necessário a remoção entre o prodomínio NH₂-terminal na sequência PRCGXPD e a região catalítica. Desta forma, o sítio de ligação Zn²⁺ pode se ligar a substratos

específicos, inibidores endógenos e receptores de superfície celular (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012) (FIGURA 1). Com base na sua estrutura primária e especificidade ao substrato, as MMPs são classificadas em collagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromalisinas (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 e MMP26), metaloproteinases de membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25), entre outras MMPs (HOPPS; CAIMI, 2012).

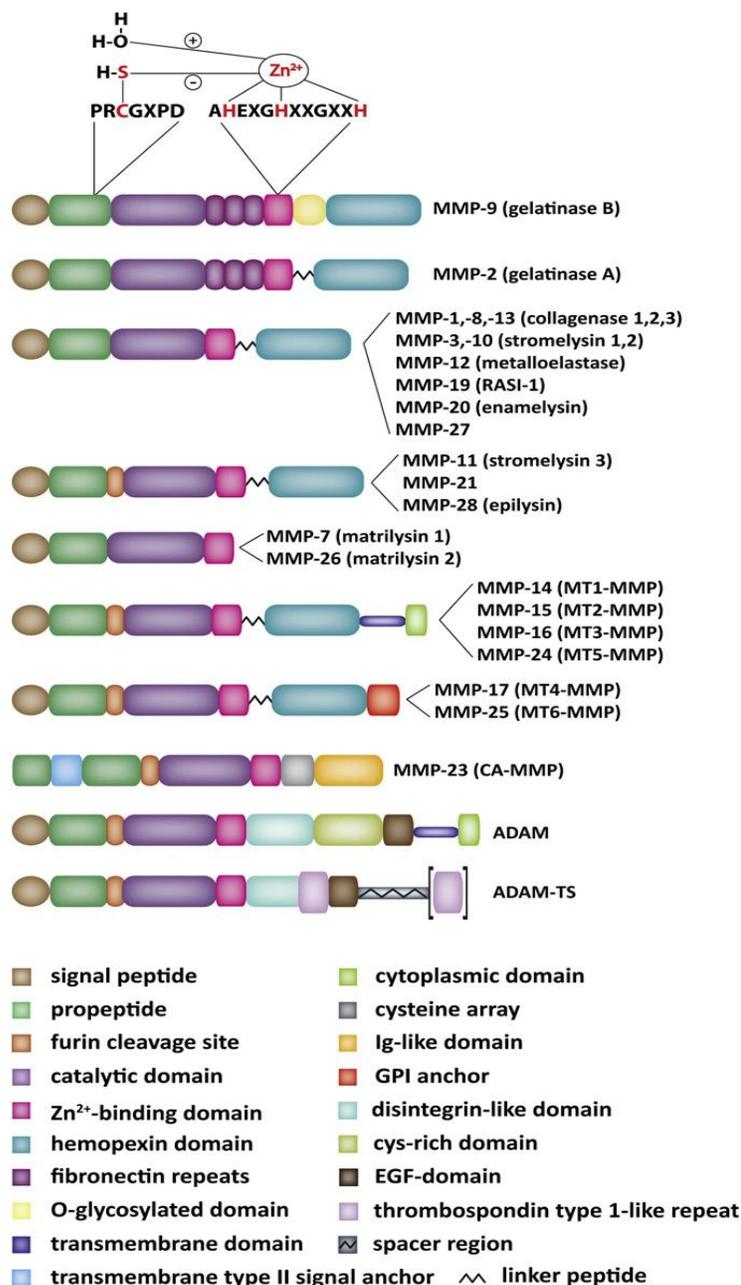


FIGURA 1: Representação esquemática da organização dos domínios de MMPs, ADAMs e ADAM-TS. (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

Vários mecanismos atuam para assegurar que a degradação dos componentes da matriz pelas MMPs sejam precisamente controlados; os principais são: ativação local, confinamento por receptores de superfície celular e secreção de inibidores, incluindo os inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs). Os TIMPs agem bloqueando o sítio ativo das MMPs, impedindo assim, o acesso das MMPs ao substrato (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012) FIGURA 2. Há quatro tipos mais conhecidos de TIMPs: 1, 2, 3 e 4 (JAOUDE; KOH, 2016). Portanto, há sempre uma degradação controlada e re-síntese (*turnover*) dos componentes da matriz extracelular, que juntamente com vascularização adequada garantem uma expansão saudável do tecido adiposo (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). No entanto, há relatos que na obesidade ocorre desequilíbrio entre a ativação de MMPs/TIMPs, promovendo degradação e rigidez excessiva da matriz extracelular, o que poderia limitar a hipertrofia do adipócito (VAN HUL; LIJNEN, 2008). Além disso, a expansão da vasculatura é limitada, ou seja, não é proporcional à hipertrofia rápida e excessiva dos adipócitos, gerando hipóxia e estresse metabólico, recrutamento e ativação de células inflamatórias (LEE; WU; FRIED, 2010).

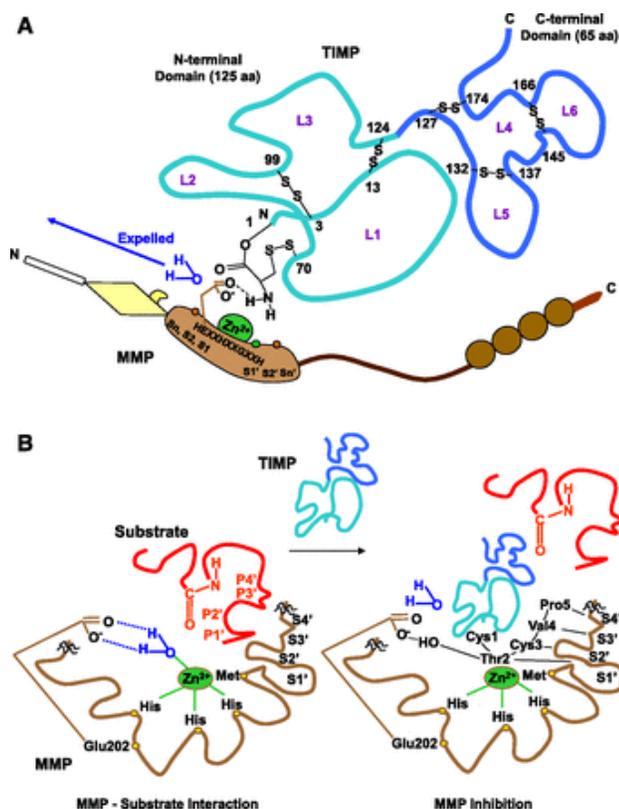


FIGURA 2: Interação entre MMP/TIMP. (A) TIMP, proteína de aminoácidos com um domínio N-terminal (L1, L2 e L3) e um domínio C-terminal (L4, L5 e L6), (B) TIMP se liga na região catalítica da MMP de modo semelhante a um substrato (MACCOLL; KHALIL, 2015).

A interação entre os diversos tipos de células do sistema imunológico está envolvida no desenvolvimento da inflamação no tecido adiposo (OUCHI et al., 2011). A infiltração de leucócitos se encontra elevada no tecido adiposo de camundongos alimentados durante 3 dias com dieta hiperlipídica e estes tem sido apontados como responsáveis pelas alterações que aparecem precocemente na obesidade (TALUKDAR et al., 2012). Os macrófagos do tecido adiposo tem recebido uma atenção especial. Classicamente macrófagos são caracterizados de acordo com o perfil de marcadores de superfície e de citocinas secretadas, como macrófagos do tipo M1 (apresentam como característica a produção de citocinas pró-inflamatórias) e macrófagos do tipo M2 (produzem citocinas anti-inflamatórias e marcadores de superfícies que o caracterizam) (BOUCKENOOGHE et al., 2014). O tecido adiposo apresenta macrófagos com características fenotípicas mistas durante a obesidade (M1 e M2), com grande capacidade de produção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α (ZEYDA; STULNIG, 2007).

Embora uma grande atenção seja dada ao infiltrado de macrófagos no tecido adiposo associada à obesidade, mastócitos podem também regular a inflamação do tecido adiposo na obesidade e o número de destas células está aumentada no tecido adiposo de pacientes e camundongos obesos (LIU et al., 2009). Além disso, camundongos C57BL/6-Kit^{W-Sh/W-Sh} deficientes de mastócitos são resistentes à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e mostram uma redução de respostas inflamatórias e resistência à insulina (ZHANG et al., 2014). Outros tipos celulares, como células T reguladoras, células T efetoras CD8+, Células T CD4+ (Th1 e Th2), células T natural killer (NKT), células B, células dendríticas e eosinófilos também são encontrados no tecido adiposo e têm sido implicados na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade (SUGANAMI; OGAWA, 2010).

Alguns relatos de literatura tem correlacionado a inflamação com o remodelamento no tecido adiposo durante a obesidade. Mediadores inflamatórios secretados por macrófagos parecem estimular em pré-adipócitos a síntese excessiva de componentes da matriz extracelular, como colágenos, reduzindo a plasticidade do tecido adiposo e gerando fibrose (KEOPHIPHATH et al., 2009). Tenascina C, é uma glicoproteína de matriz extracelular, mas também é superexpressa por pré-adipócitos após estimulação com fatores liberados de macrófagos ativados, apresenta efeitos pró-inflamatórios através da indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e de MMPs (CATALAN et al., 2012).

No entanto, em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica e significativa perda de peso, a expressão de genes relacionados à elementos da matriz extracelular, tais como as integrinas (ITGAV, ITGM, ITGB1, ITGB2 e ITGB5), colágenos (COL4A1, COL5A2 e COL12A1),

laminina (LAMB1), além de desintegrina e metaloproteinasas (ADAM12 e ADAM9) se mantiveram elevados enquanto que a expressão de genes relacionados à ativação de macrófagos (CCL18, CD163, ITGAV e Mac-1) e citocinas inflamatórias (IL1, IL1R1 e IL15) foram reduzidos (HENEGAR et al., 2008). Adicionalmente, a fibrose intersticial também não se modificou após 3 meses da cirurgia bariátrica, sugerindo um certo grau de irreversibilidade nas alterações de matriz extracelular e uma falta de correlação com a inflamação local (HENEGAR et al., 2008). Trabalhos utilizando animais de experimentação, dietas hipercalóricas e ciclos de restrição alimentar também têm mostrado que nem todas as alterações induzidas pela obesidade são revertidas durante o período de emagrecimento. Camundongos mantidos em dieta hiperlipídica e submetidos a perda de peso, apresentaram concentrações séricas elevadas de alanina aminotransferase (ALT) sugerindo que alterações hepáticas demandem de um tempo maior para serem restabelecidas (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2013), níveis hipotalâmicos elevados de NPY e AgRP, peptídeos orexígenos, enquanto os níveis de peptídeos anorexígenos (POMC e CART) não se alteraram, o que sugere um aumento de apetite como consequência da perda de peso (YU; DENG; HUANG, 2009). Por outro lado, camundongos obesos submetidos a um ciclo de perda e um ciclo de ganho de peso, apresentaram a mesma composição corporal (peso, adiposidade) e status metabólico (colesterol, triglicerídeos, resposta glicêmica) que os controles que se mantiveram obesos durante o mesmo período (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012). Quanto ao remodelamento do tecido adiposo nos animais submetidos ao ganho de peso, o número de adipócitos estava aumentado (hiperplasia) (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012). A avaliação do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo revelou que os ciclos de perda e ganho não alteraram a presença ou fenótipo de macrófagos, mas aumentaram a presença de linfócitos T e de suas citocinas (ANDERSON et al., 2013). Ciclos curtos de dieta hipercalória/restrrição alimentar aplicados em camundongos resultaram novamente em uma maior adiposidade, alterações no remodelamento do tecido adiposo (maior número de adipócitos), na eficiência energética e na expressão de genes relacionados ao ritmo circadiano (DANKEL et al., 2013). Não há relatos adicionais sobre alterações de matriz extracelular durante os ciclos de perda e ganho de peso em animais experimentais. Como vimos, o tecido adiposo responde de forma dinâmica ao excesso de nutrientes provenientes da dieta, através da hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, seguido pelo aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias, da infiltração de células imunológicas inflamatórias, processos que são dependentes do remodelamento tecidual (WILLIAMS; KANG; WASSERMAN, 2015).

1.2 Mastócitos e remodelamento tecidual

É bem conhecido o papel dos mastócitos em reações alérgicas (BUECHLER; KRAUTBAUER; EISINGER, 2015). Mas essas células também liberam substâncias com atividades biológicas responsáveis pela modulação das respostas inflamatórias e imunológicas, assim como em processos de angiogênese e remodelamento tecidual (SISMANOPOULOS et al., 2013). Mastócitos possuem grânulos citoplasmáticos ricos em proteoglicanas, proteases e outras substâncias. Quando ativadas, estas células realizam o processo de desgranulação, por meio do qual, diversas substâncias pré-formadas são liberadas no espaço extracelular. Em adição ao conteúdo dos grânulos pré-formados, os mastócitos ativados podem realizar a neosíntese de mediadores, além de serem uma fonte importante de secreção de heparina e de enzimas proteolíticas como triptase e cimase, que participam na degradação do tecido conjuntivo (MCNEIL, 1996).

Em órgãos como fígado e pulmão, os mastócitos encontrados em regiões de fibrose, promovem proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno por secretarem vários mediadores (DIVOUX et al., 2012). Como vimos, o aumento do número de mastócitos têm sido relacionado positivamente com o desenvolvimento da obesidade que é acompanhada pelo estabelecimento de fibrose, pelo aumento da síntese de colágeno IV (HIRAI et al., 2013) bem como pelo acúmulo de macrófagos (BUECHLER; KRAUTBAUER; EISINGER, 2015). *In vitro*, mastócitos derivados de medula óssea de camundongos foram capazes de aumentar a transcrição de genes relacionadas a síntese de colágeno em fibroblastos por um mecanismo dependente da secreção de protease de mastócito-6 (MCP-6) (HIRAI et al., 2013). Em humanos, mastócitos foram localizados em áreas de fibrose no tecido adiposo subcutâneo ou visceral de obesos e foram capazes de secretar mais IL-6, IL-16, 1L-1 β , IL-1ra, MIP-1 α , GRO α , GCSF e PAI-1 que mastócitos isolados dos controles magros (DIVOUX et al., 2012). Mastócitos também foram apontados como capazes de induzir adipogênese através da liberação de 15-deoxi-delta-PGJ2 (TANAKA et al., 2011).

A deficiência genética ou inativação de mastócitos a partir de estabilizadores farmacológicos reduzem o peso corporal em camundongos, reduzem a expressão de citocinas, quimiocinas e proteases, melhorando a homeostase de glicose (LIU et al., 2009) (WANG, J.; SHI, 2011). O cromoglicato de sódio, também conhecido como cromolin, é um fármaco denominado estabilizador das membranas celulares dos mastócitos, o que resulta na inibição dos mediadores inflamatórios (WANG, G. L. et al., 2008). A administração de cromoglicato foi capaz de reduzir a expressão de IL-6, TNF- α , IFN- γ e MCP-1, além da

expressão de MMP-9 no soro e no tecido adiposo em camundongos obesos (LIU et al., 2009). Em modelo de camundongos com aterosclerose, o cromoglicato reduziu as lesões e o infiltrado de macrófagos e células T nas placas de ateroma (WANG, G. L. et al., 2008). Em ratos com lesão aguda nos tendões patelares, o cromoglicato regulou negativamente vários genes associados com a fibrose de tendão, além de aumentar a organização do colágeno e atenuar o desenvolvimento de hiper celularidade e espessamento do tendão pós-lesão (SHARMA et al., 2011).

1.3 Metaloproteinases de matriz (MMPs) e remodelamento tecidual

As MMPs desempenham um papel importante sobre o remodelamento do tecido adiposo (LIN; CHUN; KANG, 2016). A matriz extracelular de pré-adipócitos é composta principalmente de colágenos fibrilares tipo I e III e, fibronectina. Após a diferenciação destes, estas proteínas são reguladas negativamente dando lugar a uma estrutura de membrana basal laminar composta por colágeno IV, entactina e laminina. MMPs, TIMPs e receptores de adesão da família das integrinas são capazes de influenciar a adipogênese (GAGNON et al., 2012).

Na obesidade, a expressão de MMPs está aumentada o que potencializa a degradação dos componentes da matriz extracelular (VAN HUL; LIJNEN, 2008). A MMP-1 é uma protease capaz de degradar vários tipos de colágenos (I-III, VII, VIII, e X), estimulando o remodelamento tecidual durante a expansão do tecido adiposo (JAOUDE; KOH, 2016). As concentrações plasmáticas das gelatinases (MMP-2 e -9), principais MMPs circulantes, se encontram aumentadas em indivíduos obesos (LIN; CHUN; KANG, 2016). No entanto, em camundongos obesos geneticamente ou alimentados com dieta hiperlipídica, a expressão gênica de MMP-2 está aumentada, mas de MMP-9 reduzida no tecido adiposo (JAOUDE; KOH, 2016). Essas gelatinases degradam laminina e colágeno IV, elementos que compõem a lâmina basal dos tecidos (NABESHIMA et al., 2002), mas a deposição de elementos da matriz extracelular em excesso gera fibrose no tecido adiposo, afetando diretamente a capacidade dos adipócitos de se expandirem (KHAN et al., 2009). A MMP-12, conhecida como elastase de macrófagos está associada à infiltração de macrófagos durante a expansão do tecido adiposo (BAUTERS; VAN HUL; LIJNEN, 2013). Macrófagos residentes no tecido adiposo de camundongos obesos, especificamente os CD11c (tipo M1) expressam níveis elevados de MMP-12 (LIN; CHUN; KANG, 2016). A MMP-12 é a principal MMP responsável pela degradação de elastina (LIN; CHUN; KANG, 2016), mas também pode degradar outros componentes da matriz extracelular, tais como colágeno IV, fibronectina e laminina (JAOUDE; KOH, 2016). Outras MMPs também

podem estar aumentadas na obesidade, porém os resultados são contraditórios e as interações funcionais entre as MMPs e o remodelamento tecidual não estão totalmente esclarecidos. Por outro lado, a ativação dos TIMPs regula a degradação excessiva dos componentes da matriz extracelular pelas MMPs (LIN; CHUN; KANG, 2016). Enquanto o TIMP-1 inibe MMP-1, -3, -7 e -9; TIMP-2 inibe especificamente MMP-2; TIMP-3 pode inibir MMP-2 e -9; e TIMP-4 inibe MT-1 MMP e MMP-2 (HOPPS; CAIMI, 2012). Dentre as principais funções dos TIMPs, tais como a regulação da proliferação, migração e invasão celular, anti-angiogênese e apoptose são decorrentes da inibição das MMPs (HOPPS; CAIMI, 2012).

Inibidores sintéticos de MMPs têm sido utilizados como estratégia para intervir com a atividade não controlada das MMPs. A maioria desses compostos são quelantes de zinco, e portanto, são capazes de bloquear o sítio catalítico das MMPs, levando a um rearranjo conformacional entre MMP/inibidor, que resulta na perda da atividade enzimática dessas proteases (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

Alguns estudos experimentais mostraram resultados interessantes dos inibidores sintéticos de MMPs sobre o remodelamento tecidual associado a expansão do tecido adiposo. O GM6001, também conhecido como galardin ou ilomastat, é um inibidor de amplo espectro, sendo capaz de inibir gelatinases, collagenases, entre outras MMPs. O tratamento de camundongos da linhagem C567BL com o GM6001 durante o estabelecimento da obesidade foi capaz de inibir a atividade de MMP-2 e MMP-9 em tecido adiposo subcutâneo e gonadal, gerando uma maior quantidade de colágeno total e limitando a expansão do tecido adiposo (LIJNEN et al., 2002). O RO 28-2653, inibiu parcialmente a atividade gelatinolítica, com redução de peso corporal, do diâmetro dos adipócitos e aumento do teor de colágeno fibrilar em camundongos obesos (DEMEULEMEESTER; COLLEN; LIJNEN, 2005). O CP-544439, um inibidor seletivo para MMP-13, reduziu a adiposidade, melhorou os parâmetros glicêmicos e também reteve a expansão do tecido adiposo em camundongos obesos (SHIH; AJUWON, 2015). Na linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, inibidores de MMPs reduziram a diferenciação em adipócitos, com diminuição dos níveis de triglicerídeos e liberação de glicerol (BOULOUMIE et al., 2001); (SHIH; AJUWON, 2015). A perda de triglicerídeos em 3T3-L1 diminui o volume da célula, mas gera instabilidade à matriz extracelular, como consequência entre a tensão mecânica imposta sobre a regressão do adipócito e a rigidez da matriz extracelular, e desta forma, a perda de gordura dos adipócitos, não atinge sua totalidade (MARIMAN; WANG, 2010).

Está claro que nem todas as alterações induzidas pela obesidade são revertidas durante o período de emagrecimento no tecido adiposo e podem potencialmente contribuir para o agravamento do quadro deletério associado ao processo de reengorda que é muito comum em pacientes que passaram por dietas restritivas ou cirurgia bariátrica. Desta forma, se faz importante estudar como os ciclos de perda e reganho de peso interferem com o remodelamento do tecido adiposo visceral, visto que os componentes da matriz extracelular podem interferir com o processo inflamatório e a celularidade (tamanho dos adipócitos e infiltrado celular). Como os mastócitos são células que participam de processos inflamatórios e de remodelamento em outros tecidos e doenças, a estabilização destas células com o cromoglicato de sódio durante o período de emagrecimento e reengorda poderia auxiliar na compreensão da função dos mastócitos sobre as alterações de matriz extracelular também no tecido adiposo. Ainda, o uso de um inibidor de MMPs, o GM6001, no processo de emagrecimento poderia agregar conhecimento sobre o papel das MMPs no processo de regressão do tecido adiposo e se esta inibição poderia melhorar ou reverter as alterações inflamatórias no tecido adiposo neste período e interferir durante o período de reganho de peso.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações de matriz extracelular no tecido adiposo durante os ciclos de perda e ganho de peso em camundongos obesos correlacionando com a inflamação local, bem como o papel de mastócitos e de MMPs neste processo.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o modelo experimental de ciclos de perda e ganho de peso em camundongos obesos quanto às alterações de matriz extracelular e inflamação no tecido adiposo e, alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas.
- Avaliar se modificações na atividade de mastócitos, utilizando um estabilizador farmacológico (Cromoglicato de sódio), altera o remodelamento e a inflamação no tecido adiposo, bem como as alterações metabólicas sistêmicas durante os ciclos de perda e ganho de peso.
- Avaliar se a inibição de MMPs, utilizando um inibidor não seletivo (GM 6001), altera o remodelamento e a inflamação no tecido adiposo, bem como as alterações metabólicas sistêmicas durante os ciclos de perda e ganho de peso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo de obesidade – Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (n=110) com 5 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram acondicionados em isoladores individuais e mantidos no Biotério da Central da USF, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Os animais foram pesados semanalmente e tiveram a ingestão de ração monitorada. Os animais se serviram *ad libitum* de água e dieta hiperlipídica, e os animais que foram submetidos a restrição calórica tiveram a ingestão de dieta controlada. Os protocolos foram aprovados previamente pelo CEUA/USF sob Protocolo 001.05.2014 (Anexo I).

3.2 Protocolos experimentais de ciclos de peso

Ao completarem 5 semanas de idade, os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: grupo dieta padrão (DP) que recebeu dieta padrão AIN-93M peletizada para camundongos fabricada pela Rhoster (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) e grupo dieta hiperlipídica (DH) que recebeu dieta hiperlipídica/hipercalórica preparada em nosso laboratório conforme TABELA 1.

Após 8 semanas, 5 animais dos grupos DP e DH foram empregados para uma avaliação metabólica (glicemia de jejum e teste de tolerância à insulina conforme descrição a seguir).

Os animais do grupo DP e DH foram divididos como se segue:

- grupo DP: os animais foram mantidos em dieta padrão AIN-93M por 8 (n=5) ou 16 (n=5) semanas adicionais e submetidos a eutanásia após 16 e 24 semanas respectivamente;

- grupo DH: os animais foram mantidos em dieta hiperlipídica por 8 (n=5) ou 16 (n=5) semanas adicionais e submetidos a eutanásia após 16 e 24 semanas respectivamente;

- grupo RC: os animais já obesos foram submetidos à restrição calórica controlada substituindo-se a dieta hiperlipídica por dieta padrão AIN-93M por 8 semanas e submetidos a eutanásia após 16 semanas (n=5);

- grupo RC/RDH: os animais obesos foram submetidos à restrição calórica controlada com dieta padrão AIN-93M por 8 semanas, e após o emagrecimento, foram submetidos ao

reganho de peso com a re-introdução da dieta hiperlipídica por 8 semanas adicionais e submetidos à eutanásia após 24 semanas (n=5).

Ao final obtivemos os protocolos de 16 semanas com o ciclo de perda de peso e um protocolo de 24 semanas com o ciclo de reganho de peso conforme FIGURA 3, sendo o total de 30 animais utilizados na caracterização deste modelo experimental.

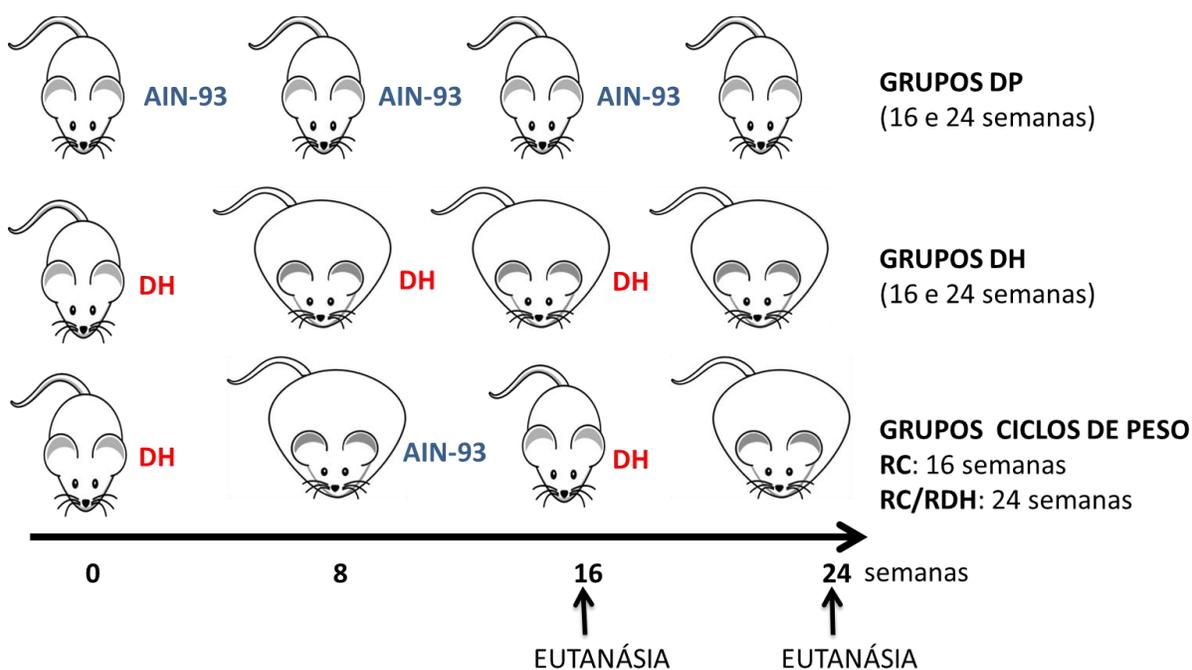


FIGURA 3. Grupos e tempos experimentais. Camundongos foram divididos em grupo DP (alimentados com AIN-93M); e grupo DH (alimentados com dieta hiperlipídica) a partir da semana 0, após a 8ª semana os animais alimentados com dieta hiperlipídica foram divididos em grupo DH e grupo RC (submetido a restrição calórica) durante 8-16 semanas. Neste protocolo temos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC (n=5) e os animais foram sacrificados na 16ª a partir da semana 0. Novamente, camundongos foram divididos nos grupos DP e DH, e outro grupo submetido a restrição calórica, o grupo RC/RDH foi reintroduzido em dieta hiperlipídica durante 16-24 semanas. Neste protocolo temos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC/RDH (n=5) e os animais foram sacrificados na 24ª semana a partir da semana 0.

TABELA 1. Composição de macronutrientes da dieta padrão (AIN-93M) e dieta hiperlipídica.

	AIN-93M (Rhooster)		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	528
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

3.3 Tratamento dos animais com Cromoglicato ou GM6001

A partir da caracterização do modelo experimental de ciclos de perda e ganho de peso, utilizamos 40 animais nos protocolos em que tratamos os animais com o cromoglicato de sódio (estabilizador de mastócitos) e outros 40 animais para os protocolos em que tratamos os animais com o GM6001 (inibidor de MMPs).

Assim, obtivemos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC (n=5) no protocolo de 16 semanas (como descrito no item 3.2), além de um grupo que recebeu o cromoglicato de sódio (10 mg/kg/dia, ip) durante o período de emagrecimento, chamado de grupo RC+CG (n=5) e no protocolo de 24 semanas, obtivemos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC/RDH (n=5) (como descrito no item 3.2), e o grupo RC/RDH+CG, em que os animais que passaram pelos ciclos de perda e ganho de peso também receberam o cromoglicato de sódio (n=5) (FIGURA 4).

Novamente, obtivemos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC (n=5) no protocolo de 16 semanas (como descrito no item 3.2), além de um grupo que recebeu o GM6001 (100 mg/kg/dia, ip) durante o período de emagrecimento, chamado de grupo RC+GM (n=5) e no protocolo de 24 semanas, obtivemos os grupos DP (n=5), DH (n=5) e RC/RDH (n=5) (como

descrito no item 3.2), e o grupo RC+GM/RDH, em que os animais que foram tratados com o GM durante o período de emagrecimento foram reintroduzidos com a dieta hiperlipídica (n=5) (FIGURA 5).

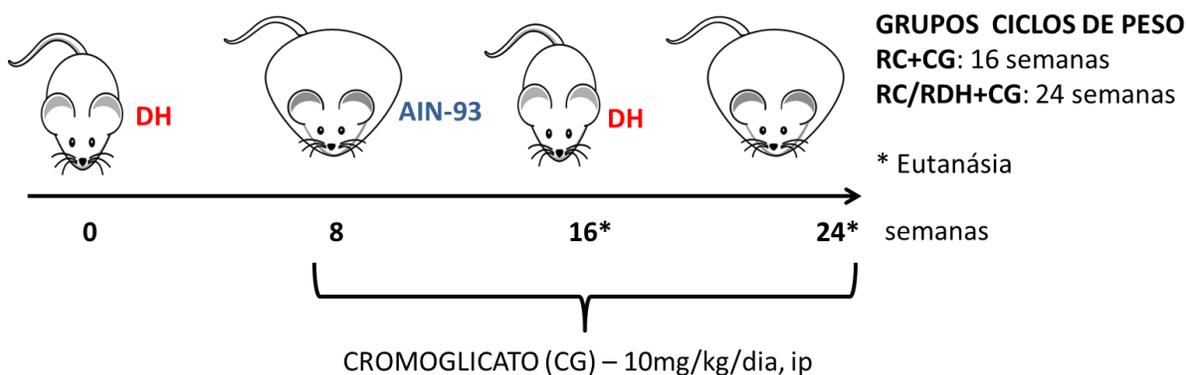


FIGURA 4. Esquema do tratamento com cromoglicato de sódio durante os protocolos de 16 e 24 semanas. Animais obesos que foram submetidos a restrição calórica e receberam o cromoglicato de sódio durante 8-16 semanas receberam o nome de grupo RC+CG no protocolo de 16 semanas, e os que receberam o cromoglicato durante 8-24 semanas, ou seja, durante a perda e reganho de peso, RC/RDH+CG no protocolo de 24 semanas.

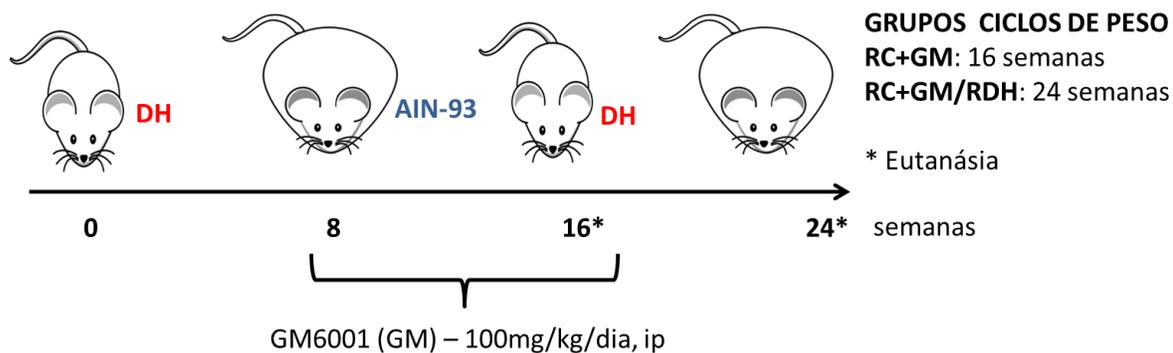


FIGURA 5. Esquema do tratamento com GM6001 durante os protocolos de 16 e 24 semanas. Animais obesos que foram submetidos a restrição calórica e receberam o GM6001 durante 8-16 semanas receberam o nome de grupo RC+GM no protocolo de 16 semanas, e os que foram reintroduzidos em dieta hiperlipídica recebem o nome de RC+GM/RDH no protocolo de 24 semanas. O tratamento com o GM6001 foi realizado apenas durante a perda de peso.

3.4 Glicemia basal e Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e, então foi realizada uma pequena incisão na cauda de cada animal para coleta de uma gota de sangue para determinação da glicemia basal utilizando-se o 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, 20 e 30 minutos. Os valores glicêmicos foram ajustados em um modelo linear e o coeficiente angular da curva foi obtido no programa GraphPadInstat (kITT). O ITT foi sempre realizado na semana que antecedeu a eutanásia.

3.5 Análise do gasto energético

Calorimetria indireta foi avaliada utilizando o sistema Oxylet/Physiocage (Panlab, Barcelona, Espanha), em que os animais foram colocados individualmente em câmaras respiratórias (temperatura: 22-23° C, umidade: 45-55%, ciclo claro escuro 12/12 hs) com fluxo de ar de 0,5 L/min. Durante as 24 hs de análise, O₂ (%) e CO₂ (%) foram medidos a cada 9 minutos. O consumo de O₂, de CO₂ e o gasto energético (kCal/h/kg^{0.75}) foram calculados pelo Software Metabolism (Panlab).

3.6 Eutanásia dos animais e coleta de materiais

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e, então foram anestesiados com uma mistura 1:1 v/v de cetamina 100mg/ml e xilasina 2% no volume de 0,3 uL para cada 100g de peso corpóreo, visando uma anestesia profunda. O sangue foi coletado utilizando seringa sem anticoagulante e utilizado na dosagem de colesterol e triglicérides por meio fitas teste (Accutrend® Plus, Roche, Manhelm, Alemanha) e, posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. O soro foi guardado em temperatura de -20°C para utilização posterior.

O animal foi eutanasiado pela retirada do coração sob efeito do anestésico. Após a eutanásia, estoques de tecido adiposo (epididimal, subcutâneo, perirenal e mesentérico), fígado e o músculo gastrocnêmio foram retirados, pesados e os valores expressos como porcentagem do peso corporal. Biópsias de tecido adiposo epididimal foram coletados e armazenados a -80°C para posterior utilização.

3.7 Obtenção e análise da fração estromal vascular a partir do tecido adiposo epididimal

Biópsias de tecido adiposo epididimal foram fragmentadas em solução contendo colagenase (1mg/ml – *Collagenase from clostridium histolyticum*/Sigma) e incubados sob agitação constante (velocidade 100 rpm) em banho-maria a 37°C, durante 45 min. A suspensão celular foi centrifugada a 1200rpm, 20°C, durante 10 minutos, e o precipitado coletado e filtrado em malhas de 150 µm e posteriormente em 37µm. As células obtidas foram utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo.

Para a análise do infiltrado de células inflamatórias do tecido adiposo epididimal, as células obtidas na etapa descrita anteriormente foram contadas e a suspensão celular ajustada para conter 1×10^6 células/mL. A suspensão celular foi alíquotada em tubos plásticos e incubadas com 2,5 µL de anticorpo conjugado com fluorocromos conforme TABELA 2, por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Após a incubação as células foram lavadas e ressuspensas em PBS para leitura imediata. A expressão de marcadores de superfície celular foi avaliada utilizando um Citômetro Capilar (Guava easyCyte 5HT - Millipore, Hayward, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada tubo. O software utilizado na leitura e análise foi o InCyte (Millipore).

TABELA 2. Marcação celular para análise por citometria do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo epididimal

Nome do tubo	Conteúdo
Branco	Somente suspensão celular
Leucócito	CD45+ (PerCP)
Macrófago	CD14+ (FITC) F4/80+ (PE) CD11b+ (PerCP)

3.8 Extração de proteína e determinação da produção de citocinas, adipocinas e MMPs no tecido adiposo epididimal

Biópsias de tecido adiposo epididimal foram coletadas e homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl150 mM, aprotinina 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na_3VO_4 10 mM, NaF100 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM e EDTA 4 mM. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm a 4°C, 45 min. O extrato foi coletado e utilizado na dosagem de proteínas totais e, posteriormente nos kits comerciais Milliplex Mouse MMP3MAG-79K

(Merck Millipore, MA, USA), Mouse Adipocyte MADCYMAG-72K (Merck Millipore) e kit comercial Quantikine ELISA Mouse IL-10 (R&D Systems, MN, USA) seguindo as instruções do fabricante. O resultado da dosagem de proteínas foi utilizado na correção da quantidade de cada analíto quantificado.

3.9 Determinação dos níveis séricos de insulina, HDL e LDL

A determinação de insulina no soro coletado dos camundongos foi realizada utilizando kit comercial Mouse Adipokine MADKMAG-71K (Merck Millipore) e a determinação os níveis de HDL e LDL por kits comerciais (Laborlab).

3.10 Avaliação da atividade das MMPs

A atividade das MMPs foi determinada por zimografia. Biópsias de tecido adiposo epididimal foram coletadas e homogeneizadas em tampão de extração contendo 50mM de Tris-HCl10 (pH 7,4), 2 M de NaCl, 0,1% de Triton X-100, 10mM de CaCl₂ e aprotinina (2µl/100ml) à 4° C. Os extratos celulares foram misturados com tampão de amostra (5 mM Tris-HCl - pH 6,8, 10% de glicerol, e 0,5% azul de bromofenol). A eletroforese foi realizada a 100 V em 8% SDS-géis de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram incubados em 0,1% de Triton X-100 durante 30 min, depois com 50mM Tris-HCl (pH 8,4) por mais 10 min à temperatura ambiente. Os géis foram incubados em tampão de incubação *overnight* (50 mM Tris-HCl – pH 7,4, 5 mM de CaCl₂, e 1µM de ZnCl₂) à 37° C. Os géis foram corados com 0,25% de azul brilhante de Coomassie R-250 e descorado com ácido acético 10% em metanol a 40%. Os géis foram fotografados em Fotodocumentador (Gel DOC™ XR + Bio Rad – CA, USA).

3.11 Análise de componentes da matriz extracelular por Western Blot

Ao sobrenadante coletado após a extração de proteínas descrita no item 3.8 foi adicionado tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS – dodecil sulfato de sódio – 10%) contendo DTT 100 mM e as amostras foram fervidas a 100° C por 5 min., aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separadas por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-collgen I, anti-collgen IV, anti-fibronectin e anti-laminin (Abcam Inc - MA, USA) *overnight* a 4°C antes de

serem reveladas com Kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare Bio-Sciences AB, UK).

3.12 Análise histológica do tecido adiposo

Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram acondicionados em formalina tamponada a 10%. Posteriormente, os fragmentos foram processados e emblocados em parafina. Cortes histológicos de 5 μ M foram desparafinizados com banhos de xilol, hidratados em banhos de álcool (100, 95, 80 e 70%) e em água, e então, foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou Picro-Sirius Red (PSR) (0,5 g de Sirius red F3B em 500ml de solução saturada de ácido pícrico) para determinação do tamanho dos adipócitos e da concentração do conteúdo de colágeno fibrilar total, respectivamente. As lâminas coradas com HE foram desidratadas em banhos de álcool (70, 80, 95 e 100%) e fixadas em xilol, enquanto as lâminas coradas com PSR foram colocadas em solução aquosa de ácido acético antes de serem desidratadas em álcool 100% e fixadas em xilol. As imagens de HE foram capturadas em um aumento de 40x com microscópio acoplado a um sistema de detecção. A mensuração do tamanho dos adipócitos foi realizada a partir da análise de 500 células por grupo com auxílio do *software ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (imagens não mostradas). As imagens da coloração com PSR foram obtidas em microscopia de fluorescência (excitação 605/70 e emissão 545/25) e a porcentagem de fibrose foi expressa como a proporção de áreas vermelhas pelo total da área do tecido adiposo em 4 campos para cada animal.

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett para comparações múltiplas. Análise das populações celulares foram realizadas utilizando o Teste de Qui Quadrado (χ^2). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Os resultados serão divididos em três partes, sendo que na primeira serão apresentados os dados obtidos durante a padronização do modelo experimental de ciclo de perda e de ganho de peso (protocolos de 16 e 24 semanas). Na segunda parte, os dados sobre os efeitos do tratamento com o estabilizador de mastócitos – cromoglicato de sódio. E, na terceira parte, os dados sobre os efeitos do tratamento com o inibidor de MMPs – GM6001.

4.1 Caracterização do modelo experimental: ciclo de perda e ganho de peso em camundongos (Parte I)

4.1.1 Estabelecimento da obesidade

Após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, os camundongos do grupo DH apresentaram uma alteração significativa no peso corpóreo ($p < 0,05$) a partir da 3ª semana quando comparado aos animais do grupo DP (FIGURA 6).

Os níveis glicêmicos estavam aumentados no grupo DH (FIGURA 7A) e o teste de tolerância à insulina resultou em uma menor redução dos níveis glicêmicos quando comparada ao grupo DP, indica a presença de resistência à insulina no grupo DH após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica (FIGURA 7B).

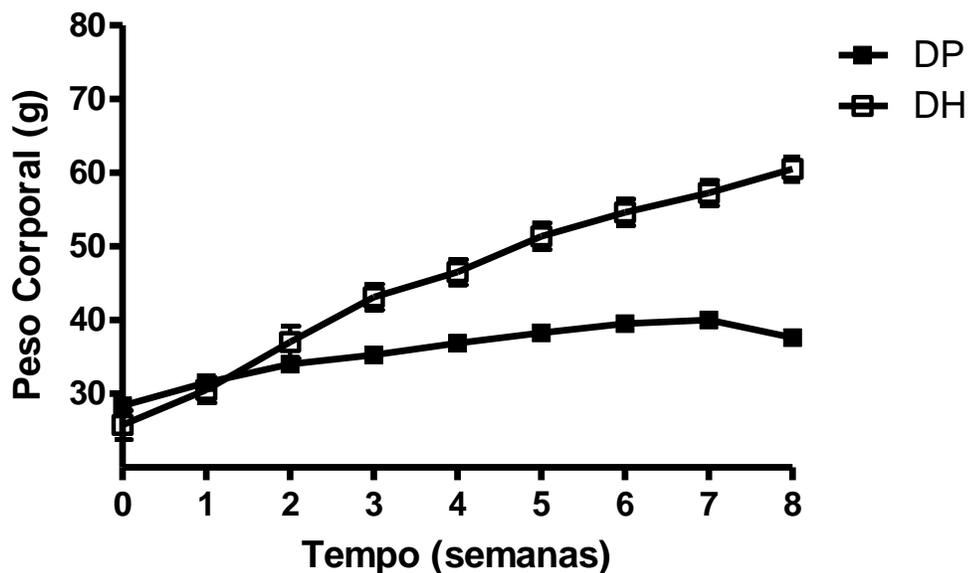


FIGURA 6. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP) e em dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas. n=10 / 5 animais por grupo.

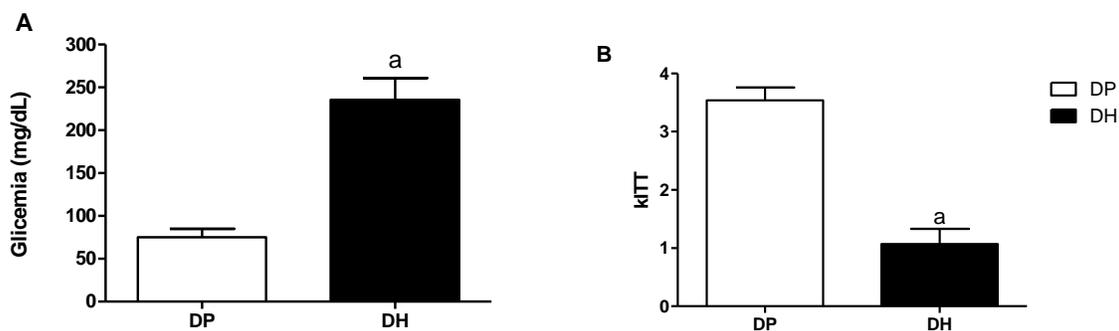


FIGURA 7. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais mantidos em dieta padrão (DP) e mantidos em dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP.

4.1.2 Ciclo de Perda de Peso

4.1.2.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

Camundongos obesos submetidos à restrição calórica (RC) apresentam uma redução significativa do peso corpóreo ($p < 0,05$) a partir da 11ª semana (FIGURA 8) e de adiposidade (FIGURA 9) quando comparados aos animais obesos (DH).

Os níveis glicêmicos estavam aumentados no grupo obeso como já mostrado, e reduzidos nos animais do grupo RC embora não sejam semelhantes ao grupo DP (FIGURA 10A) e o teste de tolerância à insulina mostrou que camundongos obesos apresentam sensibilidade a insulina e após a perda de peso esta sensibilidade é recuperada (FIGURA 10B).

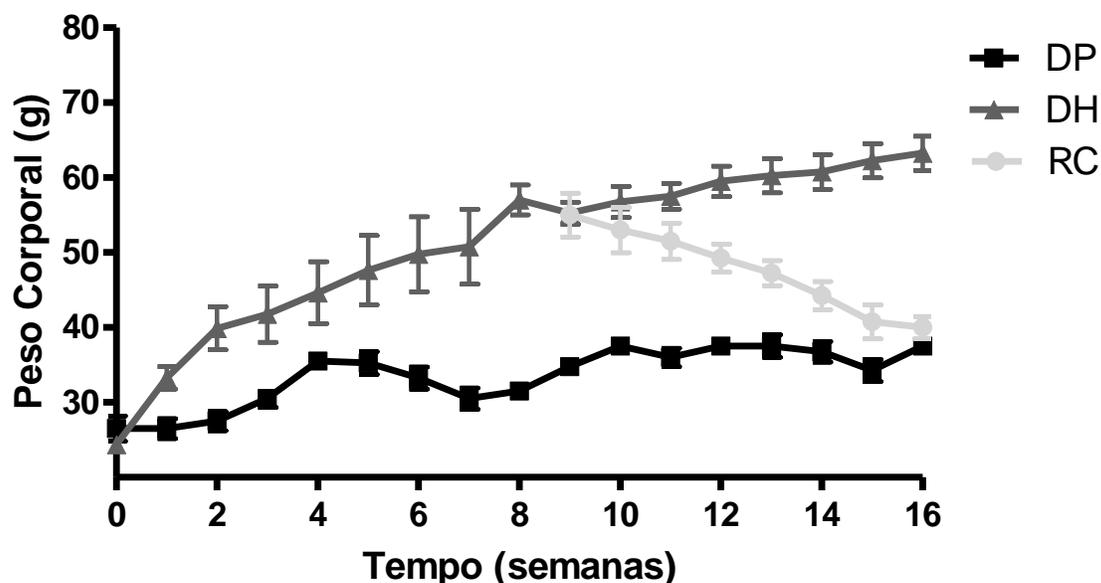


FIGURA 8. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica (RC) no protocolo de 16 semanas; (n=5).

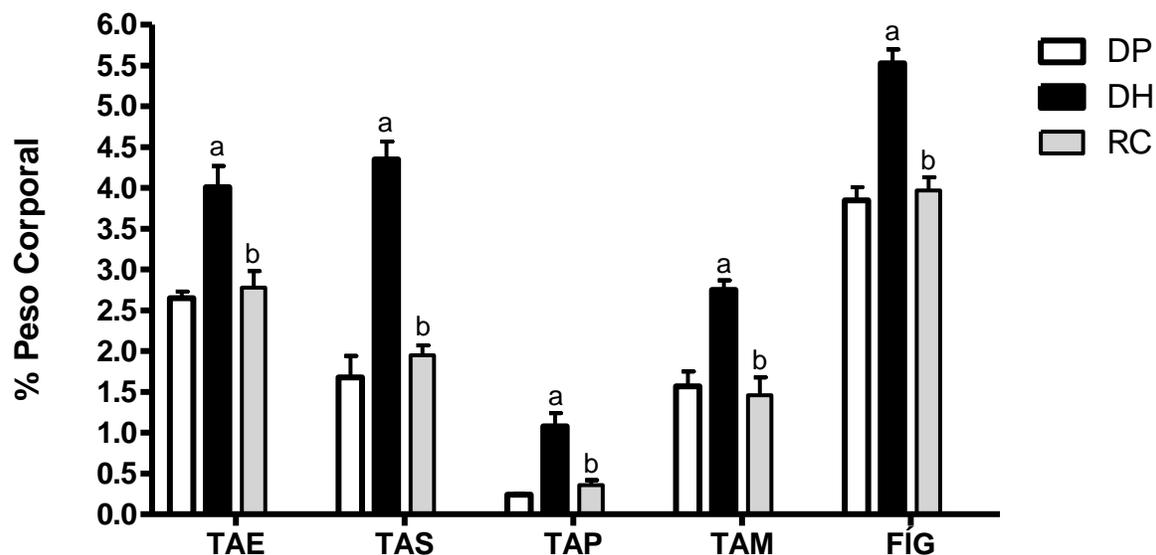


FIGURA 9. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal (TAE), subcutâneo (TAS), perirenal (TAP), mesentérico (TAM) e fígado (FÍG) dos animais DP, DH e RC no protocolo de 16 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao DP e ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH.

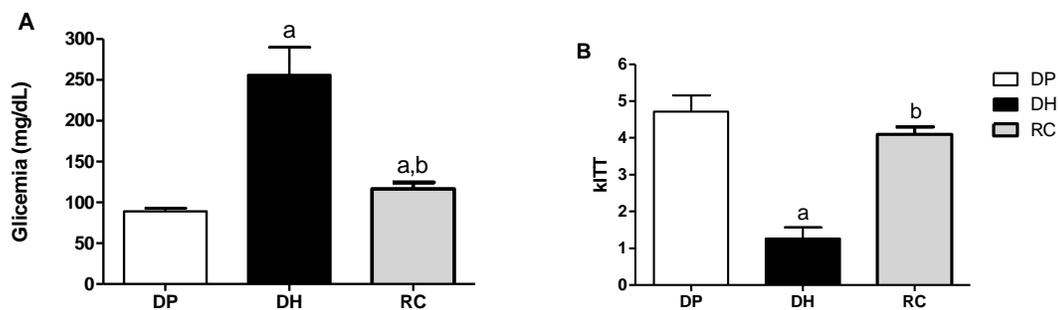


FIGURA 10. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais DP, DH e RC no protocolo de 16 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP e ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DH.

4.1.3 Ciclo de Reganho de Peso

4.1.3.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

Camundongos submetidos à restrição calórica foram reintroduzidos a dieta hiperlipídica por 8 semanas adicionais. Ao final de 24 semanas, os animais do grupo de reganho de peso (RC/RDH) mantiveram o peso corpóreo (FIGURA 11), adiposidade (FIGURA 12), níveis glicêmicos (FIGURA 13A), e resistência à insulina (FIGURA 13B) iguais aos animais obesos.

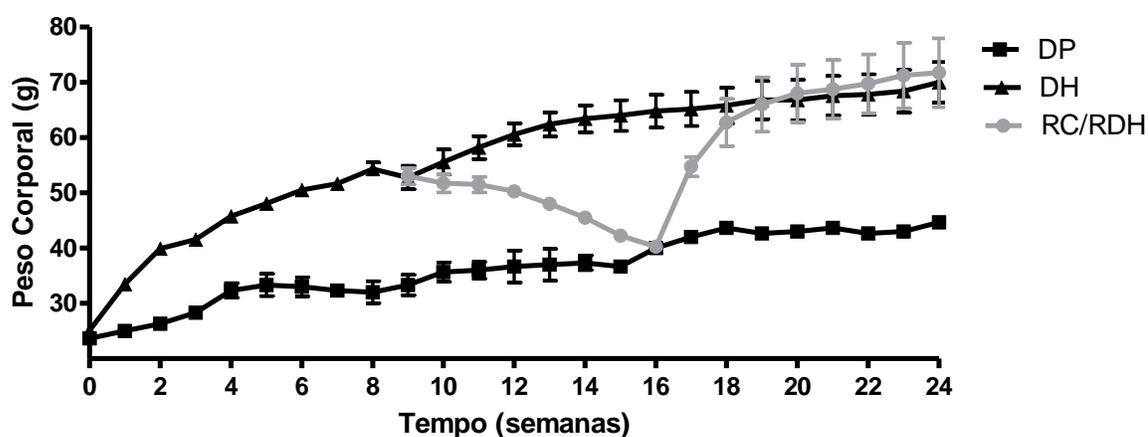


FIGURA 11. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos à restrição calórica e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) no protocolo de 24 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo.

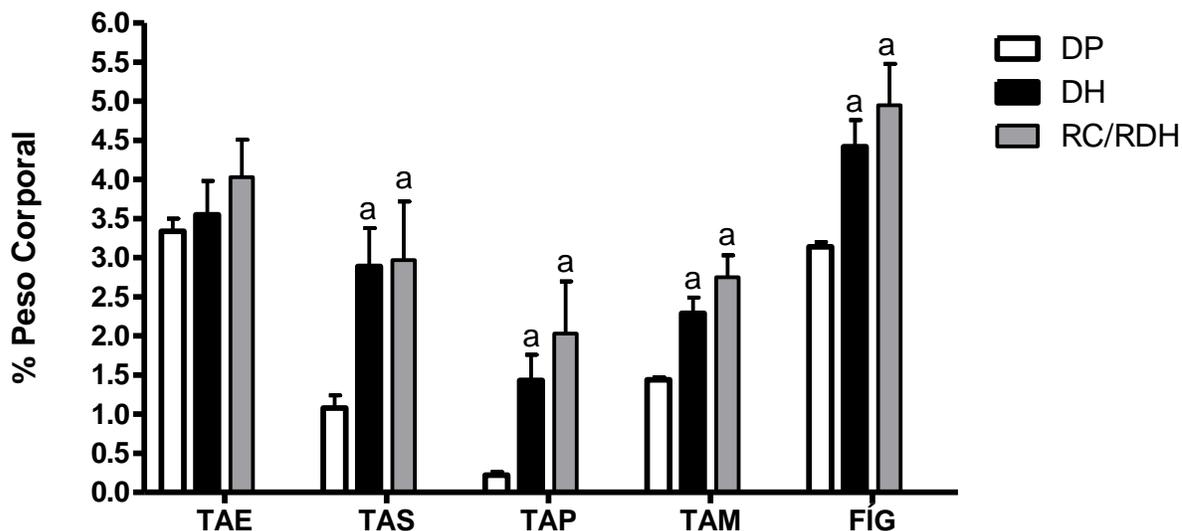


FIGURA 12. Avaliação dos estoques de tecido adiposo epididimal (TAE), subcutâneo (TAS), perirenal (TAP), mesentérico (TAM) e fígado (FÍG) dos animais DP, DH e RDH no protocolo de 24 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP.

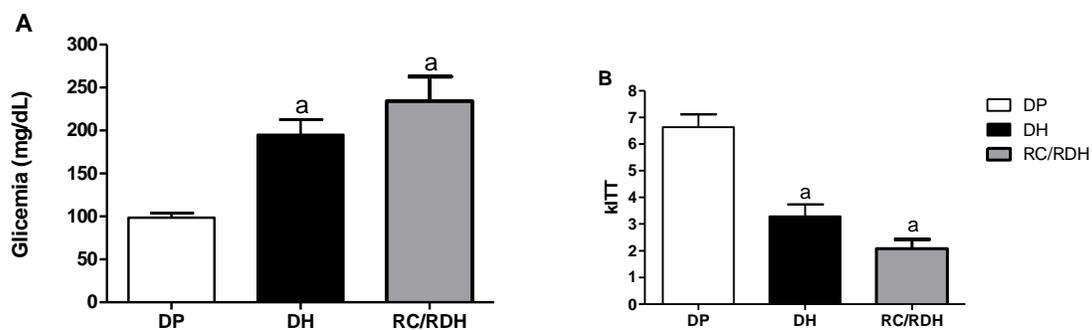


FIGURA 13. Níveis glicêmicos (A) e teste de tolerância à insulina (B) dos animais DP, DH e RC/RDH no protocolo de 24 semanas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 5 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DP.

4.2 Efeitos do tratamento com CG durante os ciclos de perda e reganho de peso (Parte II)

4.2.1 Ciclo de Perda de Peso

4.2.1.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

Camundongos tratados com CG durante o período de emagrecimento, apresentaram o mesmo peso corporal (FIGURA 14) e adiposidade (TABELA 3), além de glicemia basal e sensibilidade à insulina semelhante aos não tratados (TABELA 3).

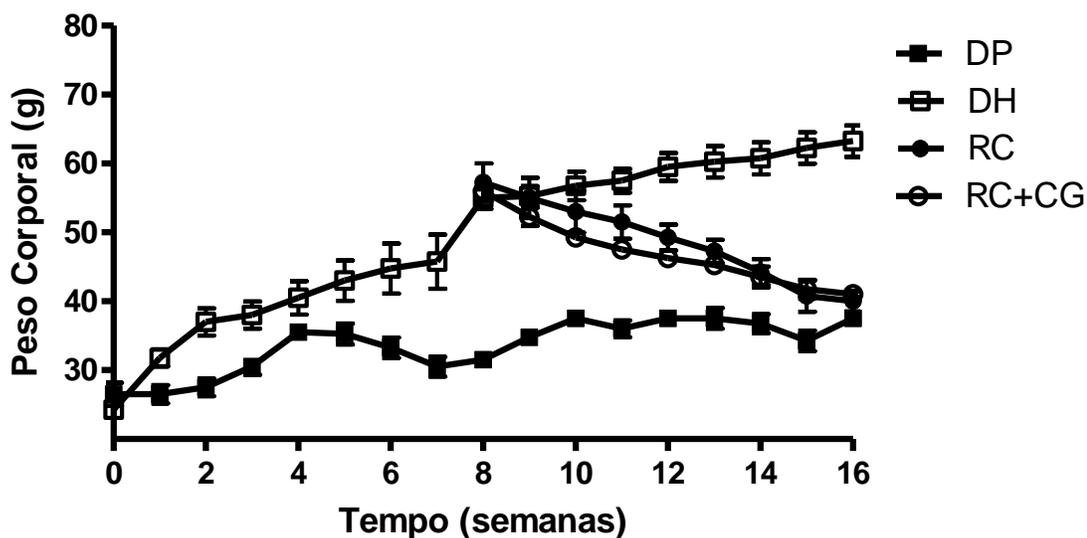


FIGURA 14. Peso corporal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio no protocolo de 16 semanas; n=5.

TABELA 3. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+CG
Peso corporal inicial (g)	26 ± 1,7	24 ± 0,5	25 ± 0,9	25 ± 0,5
Peso corporal final (g)	37 ± 0,9	63 ± 2,3 ^a	40 ± 1,5 ^b	41 ± 0,9 ^b
Tecido adiposo edipidimal ¹	2,6 ± 0,1	4 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,2 ^b	2,4 ± 0,3 ^b
Fígado ¹	3,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2 ^a	3,9 ± 0,2 ^b	4 ± 0,1 ^b
Glicose basal (mg/dL)	98 ± 5	250 ± 21 ^a	125 ± 8 ^{a,b}	130 ± 14 ^{a,b}
kITT	4,7 ± 0,3	1,3 ± 0,2 ^a	4 ± 0,1 ^{a,b}	4,3 ± 0,9 ^{a,b}

¹ Expresso em % do peso corporal. Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). ^ap<0,05 comparado ao DP e ^bp<0,05 comparado ao DH.

4.2.1.2 Avaliação da produção de adipocinas/citocinas no tecido adiposo epididimal

Animais obesos avaliados após 16 semanas apresentaram aumento do infiltrado leucócitos (CD45+) e de macrófagos (CD14+/F4/80+/CD11b) na fração estromal vascular. Após o período de restrição calórica este infiltrado estava aumentado quando comparado ao grupo DH e no grupo tratado com cromoglicato observamos redução da infiltração de leucócitos e de macrófagos quando comparado ao RC (TABELA 4).

Quanto à expressão de leptina, IL-6, MCP-1 e PAI-1 no tecido adiposo estavam semelhantes aos animais que emagreceram sem tratamento (TABELA 4).

TABELA 4. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+CG
CD45+ ¹	8,9 ± 0,4	14,2 ± 2,4 ^a	19 ± 0,6 ^{a,b}	10,9 ± 2,4 ^c
CD14+CD11b+F4/80+ ¹	7,9 ± 0,3	12,8 ± 2,3 ^a	17,3 ± 0,5 ^{a,b}	9,8 ± 2,1 ^c
Leptina (ng/mg)	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,1 ^b
IL-6 (pg/mg)	21 ± 2	74 ± 52	21 ± 4	23 ± 3
MCP-1 (pg/mg)	18 ± 3	31 ± 8	9,1 ± 2	17 ± 2
PAI-1 (pg/mg)	58 ± 14	165 ± 68	86 ± 7	82 ± 13

¹ (10⁵ cel/g tecido)

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH e ^cp<0,05 comparado ao RC.

4.2.1.3 Avaliação da produção de MMPs no tecido adiposo epididimal

Após a restrição calórica, observamos uma redução da expressão de MMP-12 no grupo tratado com cromoglicato. Não observamos diferenças significativas nas expressões de MMP-2, -3, -8 e pro-9 entre os grupos tratados ou não com o cromoglicato (TABELA 5).

TABELA 5. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+CG) ou sem (RC) tratamento simultâneo com cromoglicato de sódio no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+CG
MMP2 (pg/mg)	108 ± 10	173 ± 24 ^a	172 ± 49	149 ± 37
MMP3 (pg/mg)	365 ± 85	1351 ± 406 ^a	617 ± 255	483 ± 202
MMP8 (pg/mg)	41 ± 11	28 ± 6	17 ± 5	165 ± 73
Pro MMP9 (pg/mg)	77 ± 52	26 ± 2	30 ± 6	581 ± 373
MMP12 (pg/mg)	56 ± 17	1121 ± 291 ^a	404 ± 54 ^{a,b}	262 ± 75

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP; ^bp<0,05 comparado ao DH.

4.2.2 Ciclo de Reganho de Peso

4.2.2.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

Quando submetemos os animais ao reganho de peso, observamos uma redução de ganho de peso na 24^a semana ($p < 0,05$) dos animais tratados com CG (FIGURA 15), acompanhado de uma redução do peso do fígado (TABELA 6). Quanto aos níveis de glicemia basal e o KITT se mantiveram alterados no grupo tratado com CG de maneira semelhante ao grupo sem tratamento (TABELA 6).

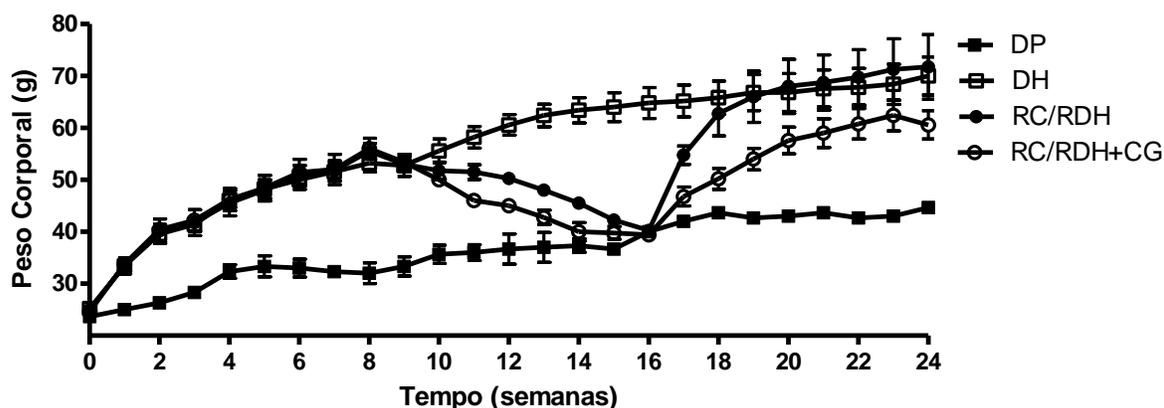


FIGURA 15. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG) no protocolo de 24 semanas; $n=5$.

TABELA 6. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG) no protocolo de 24 semanas.

	DP	DH	RC/RDH	RC/RDH+CG
Peso corporal inicial (g)	24 ± 0,9	25 ± 1	25 ± 0,4	25 ± 0,7
Peso corporal final (g)	45 ± 0,3	70 ± 3,7 ^a	72 ± 6 ^a	61 ± 2,7 ^a
Tecido adiposo edipidimal ¹	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,4	4 ± 0,5	4,2 ± 0,1
Fígado ¹	3,1 ± 0,1	4,4 ± 0,3 ^a	4,9 ± 0,5	3,1 ± 0,18 ^b
Glicose basal (mg/dL)	98 ± 5	195 ± 18 ^a	234 ± 28	196 ± 17
Kitt	6,6 ± 0,5	3,3 ± 0,4 ^a	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,5

¹Expresso em % do peso corporal

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). ^ap<0,05 e comparado ao DP ^bp<0,05 comparado ao RDH.

4.2.2.2 Avaliação da infiltração de células e da produção de adipocinas/citocinas no tecido adiposo epididimal

O infiltrado de leucócitos (CD45+) e de macrófagos (CD14+/F4/80+/CD11b+) na fração estromal vascular de animais obesos estava aumentada após 24 semanas no grupo DH quando comparado ao DP. Após um ciclo de perda e um ciclo de reganho de peso, o infiltrado de leucócitos estava aumentado quando comparado ao DH, mas o infiltrado de macrófagos permaneceu idêntica aos obesos. Já os animais que receberam cromoglicato durante os ciclos de peso tiveram aumento de leucócitos e macrófagos quando comparados ao grupo RC/RDH (TABELA 7). Em 24 semanas não observamos diferenças estatisticamente significantes na expressão de leptina, IL-6, MCP-1 e PAI-1 entre animais com ou sem tratamento com cromoglicato (TABELA 7).

TABELA 7. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG) no protocolo de 24 semanas.

	DP	DH	RC/RDH	RC/RDH+CG
CD45+ ¹	7,3 ± 0,1	8,4 ± 0,2 ^a	10,9 ± 0,1 ^{a,b}	27,9 ± 0,2 ^{a,b,c}
CD14+CD11b+F4/80+ ¹	1,2 ± 0,1	2,6 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,3 ^a	5,1 ± 0,4 ^{a,b,c}
Leptina (ng/mg)	0,4 ± 0,1	3,9 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,2 ^a
IL-6 (pg/mg)	22 ± 2	14 ± 2 ^a	26 ± 4 ^b	17 ± 3
MCP-1 (pg/mg)	19 ± 3	19 ± 3	30 ± 8	19 ± 0
PAI-1 (pg/mg)	62 ± 12	71 ± 15	144 ± 49	87 ± 15

¹ (10⁵ cel/g tecido)

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP, ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH e ^cp<0,05 quando comparado ao grupo RC/RDH.

4.2.2.3 Avaliação da produção de MMPs no tecido adiposo epididimal

Em 24 semanas não observamos diferenças estatisticamente significantes na expressão das MMPs (-2, -3, -8, pro-9 e -12) no tecido adiposo entre animais com ou sem tratamento (TABELA 8).

TABELA 8. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo dos animais mantidos em dieta controle (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com cromoglicato de sódio (RC/RDH+CG) no protocolo de 24 semanas.

	DP	DH	RC/RDH	RC/RDH+CG
MMP2 (pg/mg)	85 ± 24	179 ± 21 ^a	237 ± 36 ^a	262 ± 52 ^a
MMP3 (pg/mg)	310 ± 48	2339 ± 457	3199 ± 937 ^a	1439 ± 496 ^a
MMP8 (pg/mg)	13 ± 3	25 ± 10	356 ± 335	556 ± 350
Pro MMP9 (pg/mg)	53 ± 38	57 ± 40	1539 ± 1487	2394 ± 1311
MMP12 (pg/mg)	42 ± 6	994 ± 289 ^a	2242 ± 1038 ^a	2929 ± 1092 ^a

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP.

4.3 Efeitos do tratamento com GM6001 durante os ciclos de perda e reganho de peso (Parte III)

4.3.1 Ciclo de Perda de Peso

4.3.1.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

O tratamento com o GM6001 durante o período de emagrecimento resultou no mesmo peso corporal final (FIGURA 16) e adiposidade (TABELA 9) dos animais não tratados. Os níveis glicêmicos e o teste de tolerância à insulina mostraram que os valores ainda são diferentes dos animais controles (TABELA 9) no grupo que emagreceu com ou sem tratamento com GM6001. Os níveis de colesterol total, LDL, triglicérides e de insulina basal sérica estavam reduzidos nos animais que emagreceram quando comparados aos obesos, mas ainda se mantendo maiores que os controles magros. Somente a insulina foi reduzida adicionalmente com o tratamento com o GM6001 (TABELA 9).

A calorimetria indireta indicou que os animais obesos apresentam uma redução do gasto energético. O emagrecimento não reverte esta redução e o tratamento com o GM6001 reduz adicionalmente este parâmetro (TABELA 9).

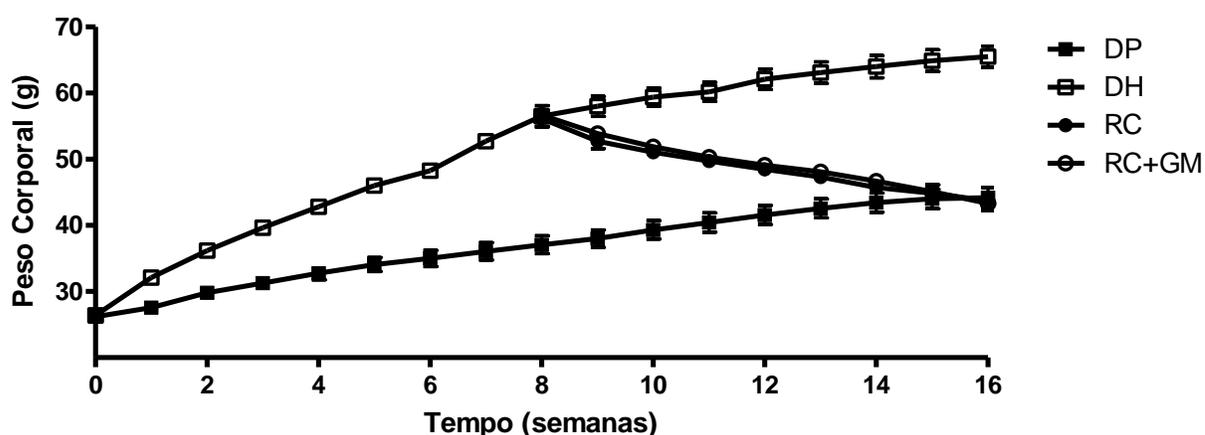


FIGURA 16. Peso corporal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM 6001 (RC+GM) no protocolo de 16 semanas; n=5.

TABELA 9. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001 no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+GM
Peso corporal final (g)	44±1,6	65±1,6 ^a	44±0,7 ^b	43±1,1 ^b
Tecido adiposo edipidimal ¹	3,4±0,06	4±0,05 ^a	3,4±0,14 ^b	3,3±0,16 ^b
Fígado ¹	4,1±0,12	6,4±0,45 ^a	4,2±0,12 ^b	4,2±0,15 ^b
Glicemia basal (mg/dL)	116±9	255±32 ^a	147±4 ^{a,b}	145±12 ^{a,b}
Insulina (ng/mL)	1,28±0,16	11,28±1,80 ^a	4,29±2,75 ^b	1,13±0,6 ^{b,c}
Kitt	5±0,5	0,9±0,2 ^a	3,2±0,4 ^{a,b}	3,5±0,6 ^{a,b}
Colesterol total (mg/dL)	161±14	285±2 ^a	206±6 ^{a,b}	198±18 ^b
HDL (mg/dL)	52±0,7	55±3,3	50±1,1	49±0,9
LDL (mg/dL)	28±6	110±14 ^a	51±9 ^{a,b}	58±11 ^{a,b}
Triglicérides (mg/dL)	153±9	258±7 ^a	189±3 ^{a,b}	175±20 ^b
EE (kcal/day/kg ^{0,75}) ²	168±12	137±6 ^a	135±9 ^a	107±8 ^{a,b,c}

¹ Expresso em % do peso corporal; ² *Energy expenditure* ou gasto energético

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). ^ap<0,05 quando comparado ao DP, ^bp<0,05 quando comparado ao DH e ^cp<0,05 quando comparado ao RC.

4.3.1.2 Atividade e expressão proteica de MMPs no tecido adiposo epididimal

O emagrecimento proporcionou intensa atividade de MMP-9 e -2 e o tratamento simultâneo com o GM6001 inibiu esta atividade (FIGURA 17). Quanto a expressão proteica das MMPs no tecido adiposo epididimal dos animais do grupo DH observamos aumento de MMP-2, MMP-3 e MMP-12 quando comparado com o grupo DP. Após o emagrecimento observamos redução de MMP-2, porém a expressão de MMP-3 e MMP-12 se mantiveram elevadas independente do tratamento com o GM6001 (TABELA 10).

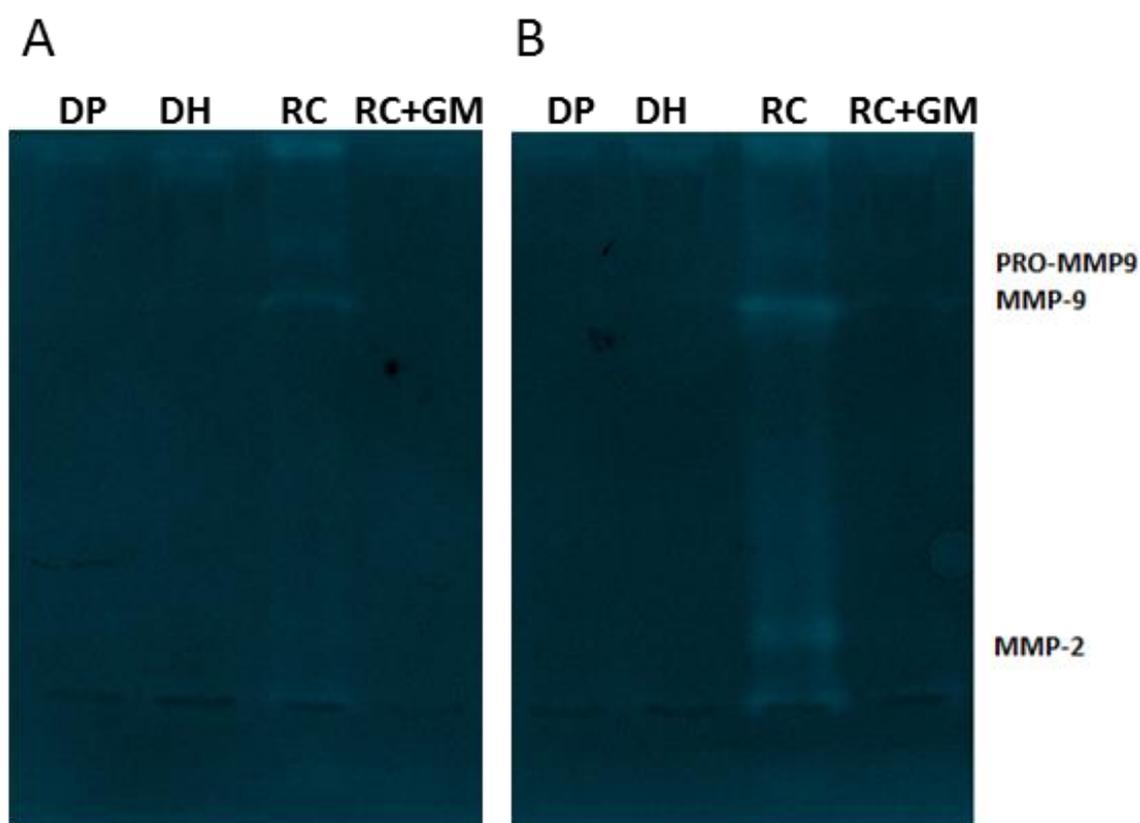


FIGURA 17. Detecção da atividade gelatinolítica no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001. Imagem representativa de dois experimentos realizados (A e B) no protocolo de 16 semanas; n=2.

TABELA 10. Expressão proteica de metaloproteinases de matriz (MMPs) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001 no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+GM
MMP2 (pg/mg)	114 ± 19	512 ± 16 ^a	334 ± 45 ^{a,b}	322 ± 69 ^{a,b}
MMP3 (pg/mg)	23 ± 4	137 ± 39 ^a	57 ± 12	85 ± 16
MMP8 (pg/mg)	6 ± 1	61 ± 19 ^a	40 ± 12	25 ± 10
Pro MMP9 (pg/mg)	8 ± 2	120 ± 51 ^a	97 ± 50	36 ± 11
MMP12 (pg/mg)	22 ± 4	551 ± 74 ^a	338 ± 69 ^a	293 ± 45 ^a

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP, ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH

4.3.1.3 Avaliação dos componentes da matriz extracelular no tecido adiposo epididimal

O grupo obeso apresentou um aumento de laminina quando comparado com grupo DP. Os animais tratados com o GM6001 tiveram a expressão de colágeno IV e laminina aumentado (FIGURA 18). Quanto à quantificação de colágeno total pela técnica de Sirius Red observamos redução deste conteúdo no grupo tratado com o GM6001 (FIGURA 19).

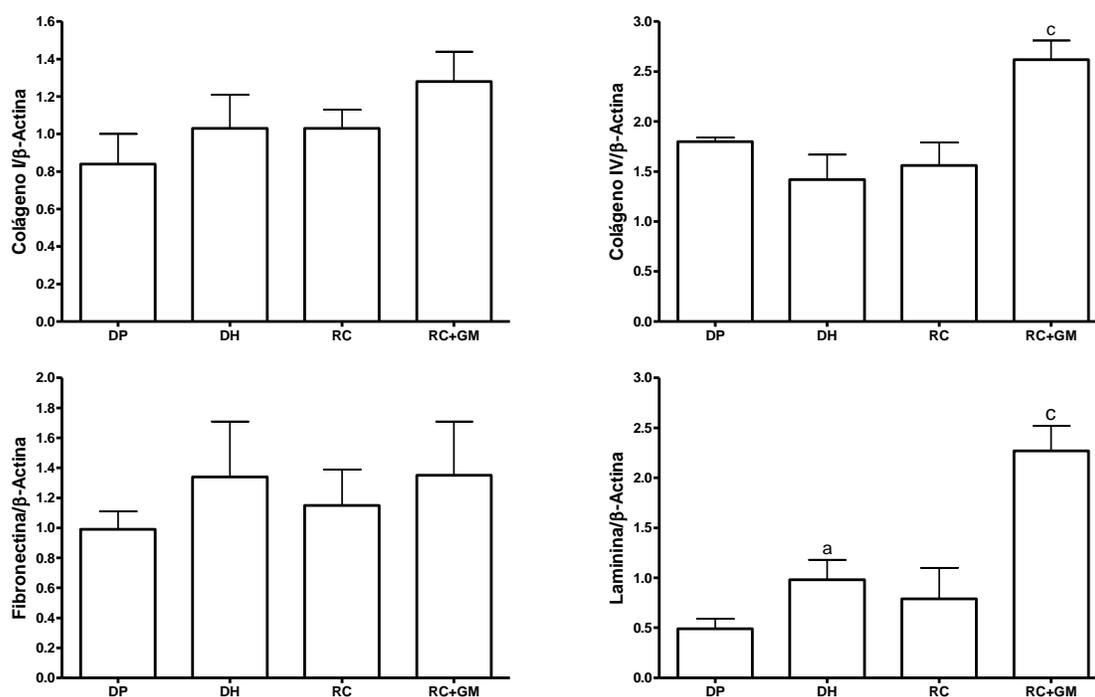


FIGURA 18. Expressão de componentes da matriz extracelular por Western Blot (colágeno I, colágeno IV, fibronectina e laminina) no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001 no protocolo de 16 semanas. (n=4) ^ap<0,05 quando comparado ao DP e ^cp<0,05 quando comparado ao RC.

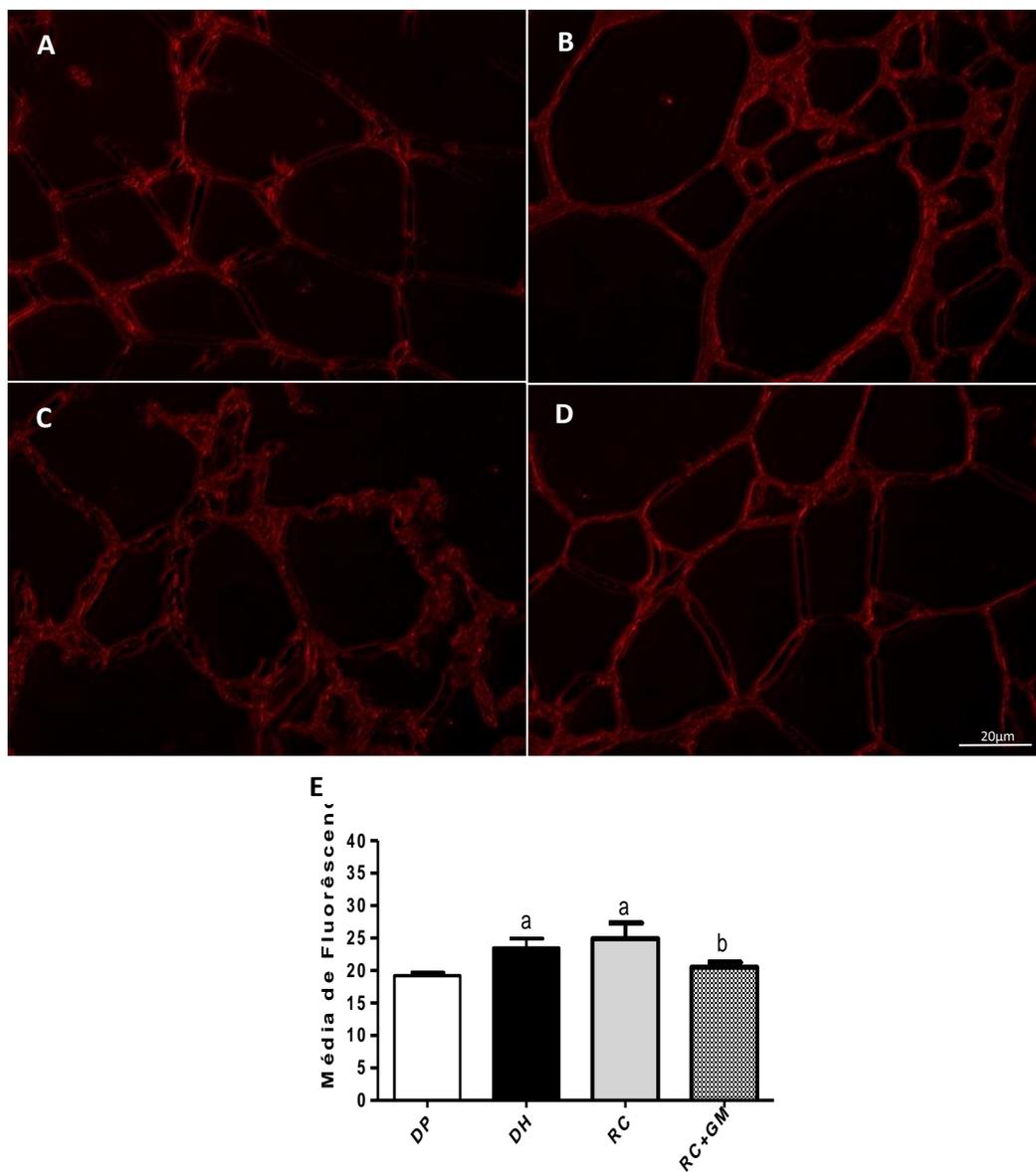


FIGURA 19. Quantificação de colágeno total (I e III) pela técnica de Sirius Red no tecido adiposo epididimal nos animais mantidos em dieta padrão (A), em dieta hiperlipídica (B) e submetidos a restrição calórica (C) e com tratamento simultâneo com GM6001 (D). Análise quantitativa de fibrose nos diferentes grupos experimentais (E) no protocolo de 16 semanas. (n=4). ^ap<0,05 quando comparado ao DP e ^bp<0,05 quando comparado ao DH. Nas figuras a barra é indicativa de 20µm; 40X aumento.

4.3.1.4 Avaliação do tamanho dos adipócitos

O tecido adiposo epididimal dos animais tratados com GM6001 apresentou uma fração maior de células com tamanho reduzido comparado aos outros grupos, e uma pequena fração de células de menor tamanho ($>10000 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo RC (FIGURA 20).

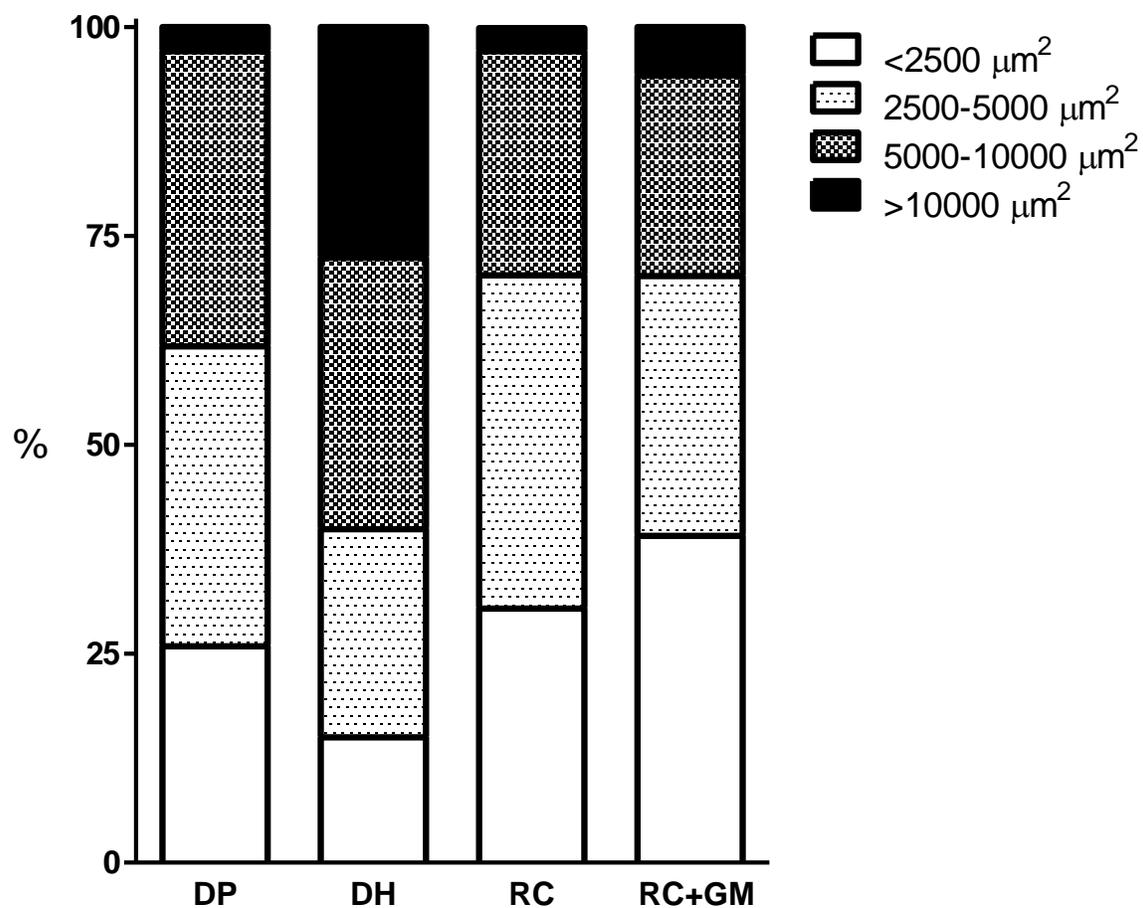


FIGURA 20. Distribuição dos adipócitos com diferentes áreas no tecido adiposo epididimal de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001 no protocolo de 16 semanas; (n=4).

4.3.1.5 Avaliação do infiltrado inflamatório no tecido adiposo epididimal

A fração estromal vascular obtida por grama de tecido adiposo epididimal dos animais tratados com GM6001 apresentou um número maior de leucócitos (CD45+) infiltrados, porém o número de macrófagos (CD14+/F4/80+/CD11b) estava reduzido quando comparado aos animais obesos (TABELA 11).

O emagrecimento reduz a expressão de leptina e MCP-1 no tecido adiposo epididimal. O tratamento com o GM6001 reduz ainda mais a expressão de MCP-1 no tecido adiposo epididimal (TABELA 11).

TABELA 11. Contagem de células na fração estromal vascular e expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica com (RC+GM) ou sem (RC) tratamento simultâneo com GM6001 no protocolo de 16 semanas.

	DP	DH	RC	RC+GM
CD45+ ¹	6,4±1.4	11,9±1.8 ^a	11,0±3.4	16,7±0.5 ^{a,b,c}
CD14+CD11b+F4/80+ ²	1,1±0.3	110,6±15.5 ^a	82,7±16.1 ^a	73,3±11.4 ^{a,b}
Adiponectina (ng/mg)	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,3 ^a
Leptina (ng/mg)	0,4 ± 0,0	1,3 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,1 ^b
IL-10 (pg/mg)	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,4	0,4 ± 0,1
IL-6 (pg/mg)	8,6 ± 1,7	12 ± 2,4	7,5 ± 1,8	7,7 ± 2,6
MCP-1 (pg/mg)	6,9 ± 1,8	30 ± 16 ^a	9,5 ± 1,9 ^b	4,7 ± 0,5 ^{b,c}

¹ (10⁵ cel/g tecido); ² (10⁴ cel/g tecido)

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP, ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH e ^cp<0,05 quando comparado ao grupo RC/RDH.

4.3.2 Ciclo de Reganho de Peso

4.3.2.1 Parâmetros antropométricos e metabólicos

Após a reintrodução de dieta hiperlipídica, observamos ganho de peso nos animais que emagreceram com ou sem tratamento com o GM6001 (FIGURA 21). Quanto à avaliação da composição corporal observamos uma redução significativa do peso do fígado quando corrigido pelo peso corporal nos animais que emagreceram com o tratamento com o GM quando comparado aos não-tratados (TABELA 12).

Os animais que emagreceram tratados com o GM apresentaram melhora da glicemia de jejum e sensibilidade a insulina, embora as concentrações séricas de insulina apresentaram-se elevadas quando comparadas aos controles, mas menores que os obesos não-tratados (TABELA 12). Os níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicérides do grupo que reengordou após ter emagrecido com tratamento com GM apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo DP (TABELA 12).

Quanto ao gasto energético não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais.

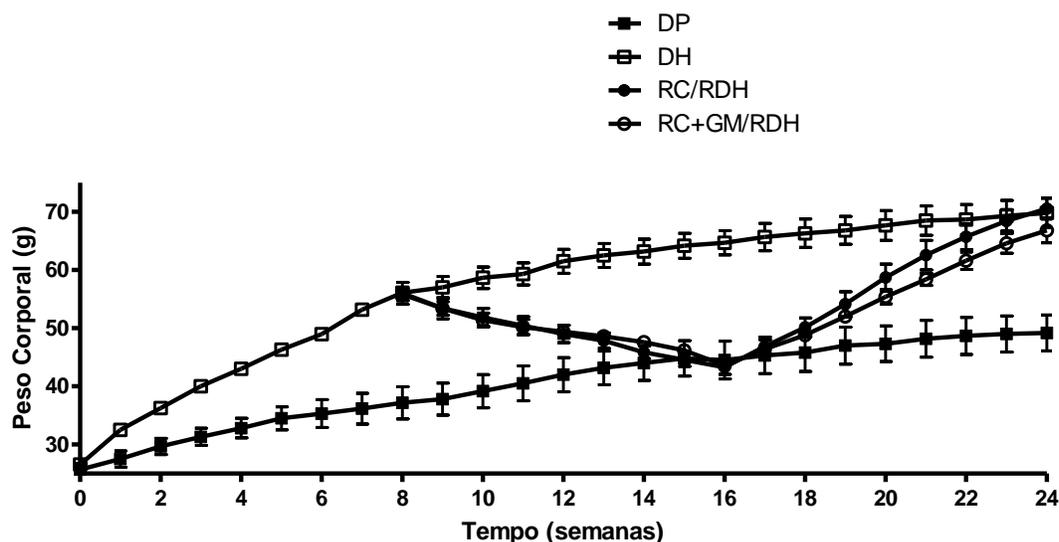


FIGURA 21. Peso corporal dos animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e tratados simultaneamente com GM6001 durante a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas; n=5.

TABELA 12. Parâmetros clínicos e metabólicos de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas.

	DP	DH	RC/RDH	RC+GM/RDH
Peso corporal final (g)	49 ± 3,1	70 ± 2,5 ^a	70 ± 1,8 ^a	67 ± 2,1
Tecido adiposo edipidimal ¹	2,7 ± 0,3	3,6 ± 0,3 ^a	4,1 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,1
Fígado ¹	3,8 ± 0,4	5,5 ± 0,3 ^a	5,4 ± 0,3 ^a	4,2 ± 0,3 ^c
Glicemia basal (mg/dL)	151 ± 10	201 ± 10 ^a	204 ± 16 ^a	168 ± 14
Insulina (ng/mL)	1,2 ± 0,7	3,4 ± 0,7 ^a	9,2 ± 3,2 ^{a,b}	6,5 ± 3,1 ^a
kITT	2,7 ± 0,6	0,5 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,3 ^{b,c}
Colesterol total (mg/dL)	205 ± 11	243 ± 11 ^a	212 ± 16	205 ± 15 ^b
HDL (mg/dL)	49 ± 0,2	53 ± 1,1 ^a	54 ± 2,7	53 ± 1 ^a
LDL (mg/dL)	60 ± 11	118 ± 8 ^a	110 ± 19 ^a	76 ± 14 ^b
Triglicérides (mg/dL)	92 ± 5	155 ± 13 ^a	143 ± 18 ^a	88 ± 5 ^{b,c}
EE (kcal/day/kg ^{0,75}) ²	125 ± 1	136 ± 4	133 ± 6	131 ± 3

¹ Expresso em % do peso corporal; ² *Energy expenditure* ou gasto energético

Os valores estão expressos em médias (n=5) seguido do erro padrão da média (EPM). ^ap<0,05 quando comparado ao DP, ^bp<0,05 quando comparado ao DH e ^cp<0,05 quando comparado ao RC/RDH.

4.3.2.2 Atividade e expressão de metaloproteinases (MMPs) no tecido adiposo epididimal

Após um período de perda e outro de reganho de peso não observamos diferenças na atividade de gelatinases entre os animais tratados ou não com o GM6001 (FIGURA 22). Já a expressão de MMP-2, 3 e 12 no tecido adiposo visceral permanece alta nos animais obesos. A expressão de MMP-2, 8, pro-9 e 12 foi ainda maior nos animais submetidos ao emagrecimento e os que emagreceram com o GM apresentaram níveis menores de MMP-2 e MMP-12 quando comparado aos não-tratados (TABELA 13).

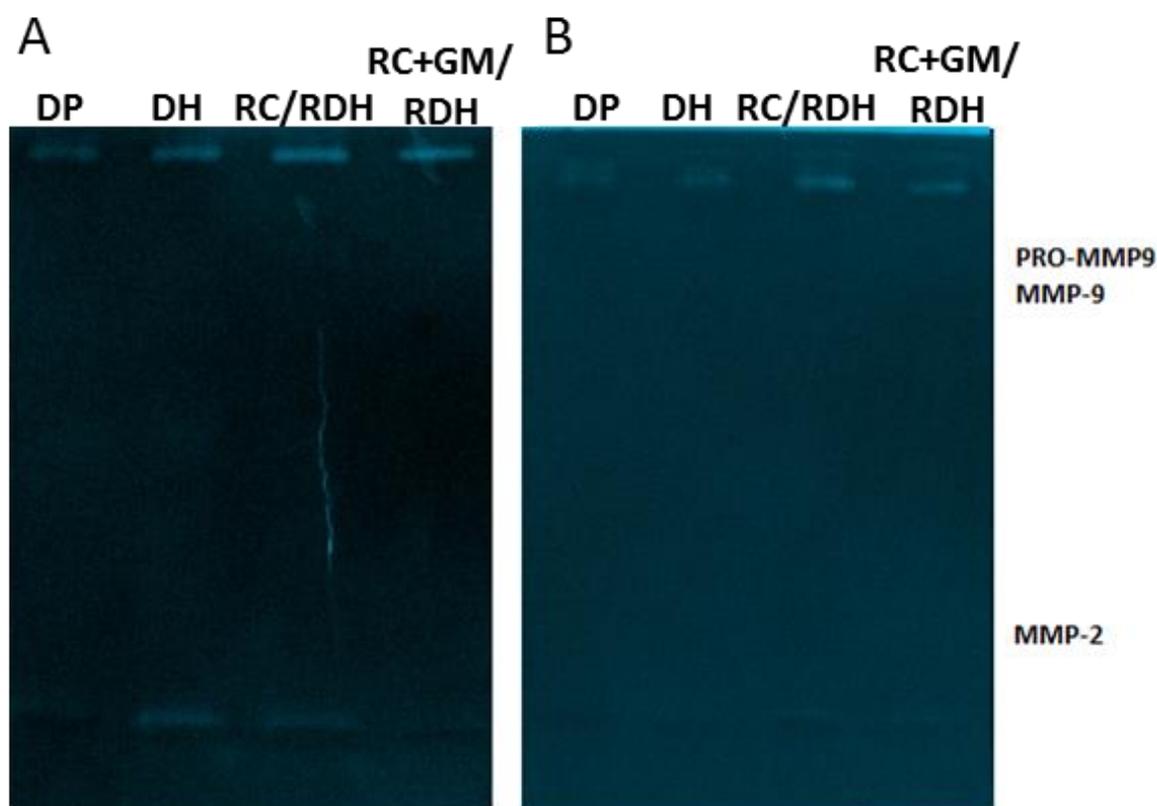


FIGURA 22. Detecção da atividade gelatinolítica no tecido adiposo epididimal de animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas. Imagem representativa de dois experimentos realizados (A e B); n=2.

TABELA 13. Expressão proteica de MMPs no tecido adiposo epididimal dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas.

	DP	DH	RC/RDH	RC+GM/RDH
MMP2 (pg/mg)	152 ± 18	252 ± 40 ^a	499 ± 45 ^{a,b}	388 ± 81 ^a
MMP3 (pg/mg)	17 ± 1,7	62 ± 8,5 ^a	68 ± 10 ^a	81 ± 29 ^a
MMP8 (pg/mg)	6,9 ± 0,2	13 ± 2,5	59 ± 18 ^{a,b}	32 ± 23
Pro MMP9 (pg/mg)	7 ± 0,4	14 ± 7,9	116 ± 52 ^{a,b}	419 ± 410 ^{a,b}
MMP12 (pg/mg)	34 ± 13	145 ± 38 ^a	292 ± 68 ^{a,b}	132 ± 34 ^{a,c}

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP, ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH, ^cp<0,05 quando comparado ao grupo RC/RDH.

4.3.2.3 Quantificação de colágeno total no tecido adiposo epididimal

Animais mantidos 24 semanas em dieta hiperlipídica apresentaram aumento do conteúdo de colágeno fibrilar total, enquanto que os animais que passaram pelos ciclos de peso com ou sem o tratamento com GM apresentaram redução deste conteúdo quando comparado ao grupo DH (FIGURA 23).

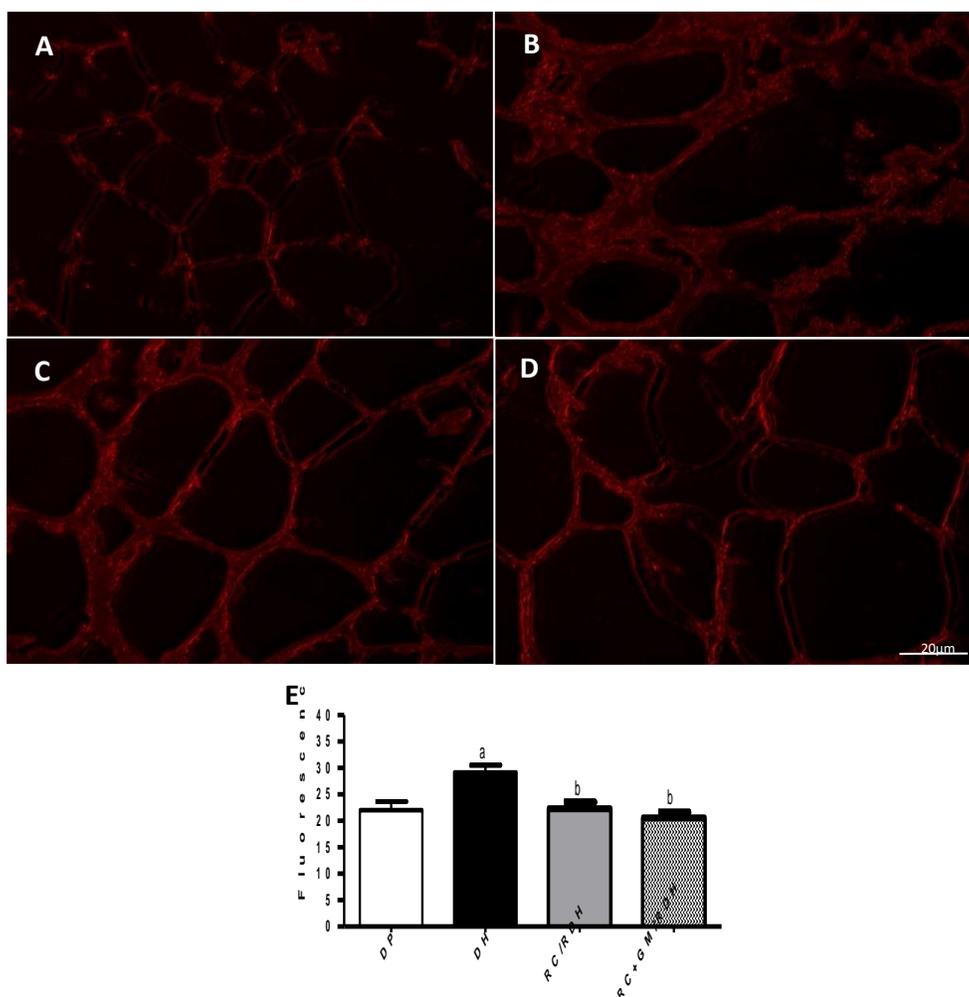


FIGURA 23. Quantificação de colágeno total (I e III) pela técnica de Sirius Red no tecido adiposo epididimal nos animais mantidos em dieta padrão (A), em dieta hiperlipídica (B) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (C) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (D) no protocolo de 24 semanas. Análise quantitativa de fibrose nos diferentes grupos experimentais (E). (n=4). ^ap<0,05 quando comparado ao DP e ^bp<0,05 quando comparado ao DH. Nas figuras a barra é indicativa de 20µm; 40X aumento.

4.3.2.4 Avaliação do tamanho dos adipócitos

Os animais que passaram pelos ciclos de peso apresentaram uma fração maior de adipócitos de menor área, mas também de maior área quando comparados aos obesos, mas sem variações entre animais emagrecidos tratados ou não com o GM (FIGURA 24).

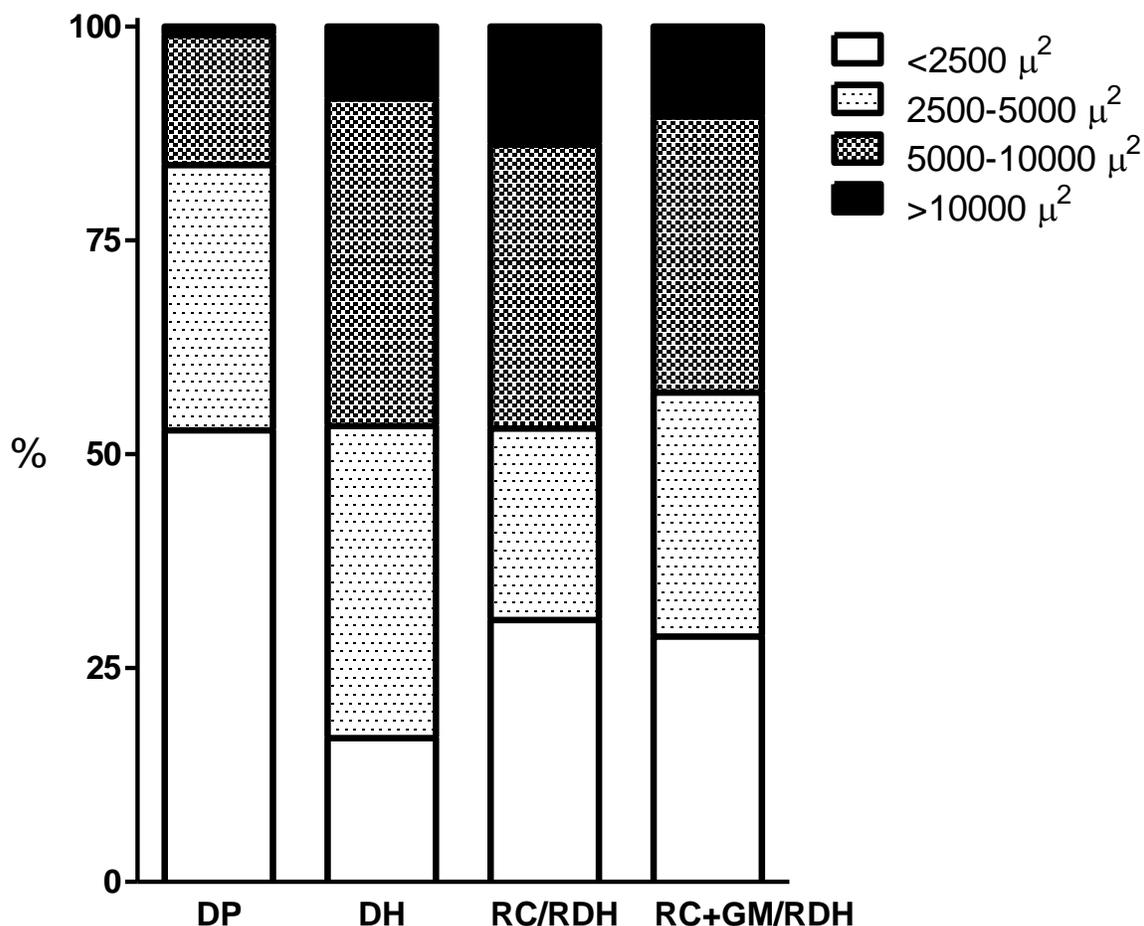


FIGURA 24. Distribuição dos adipócitos com diferentes áreas no tecido adiposo epididimal de animais mantidos em dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH) e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas; (n=4).

4.3.2.5 Avaliação do infiltrado inflamatório no tecido adiposo epididimal

Observamos aumento de leucócitos (CD45+) e de macrófagos (CD14+/F4/80+/CD11b) nos animais que passaram pelos ciclos de peso. No entanto, o tratamento com o GM resultou em maior proporção de leucócitos mas não de macrófagos do que os não tratados (TABELA 14).

Quanto a expressão de citocinas no tecido adiposo, observamos um aumento de adiponectina e de leptina nos animais submetidos a um ciclo de perda e tratamento simultâneo com GM6001 seguidos de um ciclo de reganho de peso. A expressão de IL-10 também foi significativamente maior neste grupo, enquanto a expressão de IL-6 foi reduzida (TABELA 14).

TABELA 14. Contagem de células na fração estromal vascular expressão de citocinas/adipocinas no tecido adiposo dos animais mantidos dieta padrão (DP), em dieta hiperlipídica (DH), e submetidos a restrição calórica e depois reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC/RDH) e, submetidos a restrição calórica com tratamento simultâneo com GM6001 e reintroduzidos a dieta hiperlipídica (RC+GM/RDH) no protocolo de 24 semanas .

	DP	DH	RC/RDH	RC+GM/RDH
CD45+ ¹	7,3±0,1	8,4±0,2 ^a	11,0±0,1 ^{a,b}	14,7±0,0 ^{a,b,c}
CD14+CD11b+F4/80+ ²	4,4±1,1	13,8±1,2 ^a	58,0±5,5 ^{a,b}	48,4±6,5 ^{a,b}
Adiponectina (ng/mg)	34,5 ± 5,1	19,6 ± 3,9 ^a	23,5 ± 1,1 ^a	29,1 ± 2,8 ^c
Leptina (ng/mg)	1,7 ± 0,3	3,4 ± 0,9 ^a	2,5 ± 0,5	4,5 ± 0,4 ^c
IL-10 (pg/mg)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1 ^c
IL-6 (pg/mg)	2,7 ± 0,3	4,3 ± 1,7	4,1 ± 0,3	2,6 ± 0,8 ^c
MCP-1 (pg/mg)	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,4	5,4 ± 1,9	6,9 ± 2,4

¹ (10⁵ cel/g tecido); ² (10⁴ cel/g tecido)

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM) de 4 animais. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo DP, ^bp<0,05 quando comparado ao grupo DH e ^cp<0,05 quando comparado ao grupo RC/RDH.

5. DISCUSSÃO

A perda de peso é o objetivo dos pacientes que começam a apresentar alterações metabólicas decorrentes da obesidade. Mas, na maioria das vezes além da dificuldade de perder peso, a manutenção do peso magro não é conseguida e os pacientes voltam a ganhar peso (KARMALI et al., 2013). Compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo de perda e ganho de peso pode potencialmente auxiliar os pacientes obesos. Neste trabalho, 8 semanas de dieta hiperlipídica foram suficientes para o estabelecimento de um quadro da obesidade em camundongos Swiss, caracterizado pelo aumento de peso corpóreo, associado à hiperglicemia de jejum e resistência à ação periférica da insulina. Partindo deste quadro de obesidade experimental foi possível investigar os mecanismos envolvidos durante os ciclos de perda e ganho de peso, reproduzindo experimentalmente o fenômeno conhecido como “efeito sanfona”.

Camundongos obesos submetidos à restrição calórica controlada por 8 semanas, apresentaram redução de peso corporal e adiposidade, redução da glicemia basal e a recuperação da sensibilidade periférica à insulina, quando comparados aos animais que se mantiveram obesos durante o mesmo período, como descrito previamente por outros autores (ANDERSON et al., 2013); (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012; LIST et al., 2013).

Durante o estabelecimento da obesidade, ocorre aumento da expressão de quimiocinas. Essas substâncias atraem neutrófilos, linfócitos, macrófagos e outras células inflamatórias para o tecido adiposo que passam a secretar inúmeras citocinas pró-inflamatórias (YU; DENG; HUANG, 2009). A expressão de MCP-1 no tecido adiposo é proporcional à massa adiposa e contribui para a infiltração de macrófagos e para a resistência à insulina associada com a obesidade (OHMAN; EITZMAN, 2009). A leptina é uma citocina que apresenta um papel importante no metabolismo dos lipídeos e da glicose, bem como na regulação inflamatória (KADOWAKI et al., 2006). Seus teores circulantes apresentam-se elevados em animais obesos (HALAAS et al., 1995) e reduzidos após a perda de peso (ROSENBAUM et al., 1997). Outra citocina pró-inflamatória que também está aumentada em indivíduos obesos é a IL-6. Além de sua função no metabolismo dos lipídios e da glicose, é um marcador de resistência à insulina, pois se correlaciona positivamente com níveis de insulina em jejum (NIETO-VAZQUEZ et al., 2008). O TNF- α apresenta um efeito quimiotático sobre os leucócitos, influenciando na produção e secreção de outras citocinas, contribuindo assim para a resistência a insulina (CHOE et al., 2016). Já o PAI-1 é uma citocina anti-fibrinolítica produzida pelo fígado, mas

também pelo tecido adiposo, que é a sua principal fonte na obesidade, aumentando o risco de formação de trombos e consequentemente aumentando o risco de acidentes cardiovasculares (ATHYROS et al., 2010), (PIYA; MCTERNAN; KUMAR, 2013). Além disso, sob condições fisiológicas normais, o PAI-1 controla as atividades proteolíticas de uPA, tPA, plasmina e MMP dependente de plasmina, desempenhando um papel importante no controle da coagulação sanguínea, na cicatrização de feridas, na atividade das MMPs, bem como no remodelamento da matriz extracelular (GHOSH; VAUGHAN, 2012).

Desta forma, avaliamos a expressão proteica de marcadores inflamatórios no tecido adiposo após o período de emagrecimento. Apesar da expressão de leptina, IL-6 e PAI-1 terem reduzido, o infiltrado de macrófagos, bem como a expressão de MCP-1 e de TNF- α se mantiveram elevadas mesmo após a perda de peso. Além disso, a adiponectina produzida pelos adipócitos que é reduzida durante a obesidade não foi restaurada com a perda de peso. Em estudo recente, camundongos obesos que foram submetidos a perda de peso pela interrupção de dieta hiperlipídica por 8 semanas, também apresentaram um perfil pró-inflamatório no tecido adiposo com expressão aumentada de IFN γ , TNF- α e IL-1 β (ZAMARRON et al., 2017), mostrando que a perda de peso não reverte as alterações inflamatórias estabelecidas pela obesidade no tecido adiposo.

Além da disfunção dos adipócitos e das alterações inflamatórias, as alterações de matriz extracelular também acompanham os processos de expansão e regressão do tecido adiposo. Metaloproteinases de matriz têm sua expressão aumentada na obesidade resultando em aumento da degradação de alguns componentes da matriz extracelular (CHAVEY et al., 2003; VAN HUL; LIJNEN, 2008), e um maior acúmulo na deposição de colágenos, gerando fibrose no tecido adiposo de obesos (CHUN, 2012). Em pacientes ex-obesos submetidos a cirurgia bariátrica e significativa perda de peso, a acumulação de colágeno no tecido adiposo foi persistente, e foi relacionado a fatores preditivos adicionais, tais como idade, diabetes e expressão de IL-6. Em pacientes com câncer e caquexia, a redução abrupta do tamanho dos adipócitos também foi acompanhada de fibrose no tecido adiposo (BATISTA et al., 2016). Em nosso trabalho, a perda de peso não foi capaz de reduzir a atividade de MMPs no tecido adiposo, além disso, a acumulação de colágeno estava persistente neste tecido, sugerindo um certo grau de irreversibilidade as alterações inflamatórias e de matriz extracelular no tecido adiposo após o emagrecimento.

Após a reintrodução de dieta hiperlipídica, não observamos alterações significativas no peso corpóreo, adiposidade e na resposta glicêmica dos animais quando comparados aos

animais que se mantiveram obesos durante o mesmo período. Nossos resultados estão em acordo com relatos anteriores de literatura que mostraram que o peso corpóreo final dos animais que se mantiveram obesos não diferia dos animais submetidos aos ciclos de perda e reganho de peso (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012). No entanto, este trabalho relata que animais submetidos a ciclos de perda e reganho de peso apresentam alterações na composição corporal com redução final do estoque de tecido adiposo subcutâneo (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012), o que não foi observado em nossos resultados. A avaliação da homeostase glicêmica também mostra que não há diferenças entre a glicemia de jejum ou a resposta ao teste de tolerância à insulina entre os animais obesos e aqueles que passaram pelos ciclos de perda e reganho de peso. Ou seja, o emagrecimento seguido de reengorda não traz malefícios adicionais àqueles induzidos pela obesidade quanto à homeostase glicêmica, pelo menos, experimentalmente.

Adipocinas e citocinas no tecido adiposo visceral não diferiram estatisticamente em relação ao grupo obeso, apesar do aumento do infiltrado de leucócitos totais e de macrófagos, exceto pela expressão de IL-6 que se encontra mais alta nos animais submetidos aos ciclos de perda e reganho de peso. Em um estudo anterior com camundongos que também foram submetidos a um ciclo de perda e um ciclo de reganho de peso, não apresentaram alterações de peso, adiposidade e resposta glicêmica, no entanto houve aumento da expressão de IL-6 e leptina, enquanto os níveis de adiponectina se encontraram reduzidos nos animais submetidos aos ciclos (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012). Quanto ao remodelamento do tecido adiposo, algumas MMPs como a MMP-2, MMP-8, pró-MMP-9 e MMP-12 foram detectadas em níveis mais elevados nos animais submetidos aos ciclos quando comparadas aos obesos, mas a atividade das gelatinases não estava aumentada e a fibrose estava reduzida nos animais que passaram pelos ciclos de peso, sugerindo que a fibrose não está estritamente relacionada à inflamação no tecido adiposo e que um período de regressão deste tecido pode interferir com o perfil inflamatório e de MMPs em um período de nova expansão.

Como os mastócitos podem potencialmente interferir com o remodelamento do tecido adiposo, investigamos se o tratamento com um estabilizador de mastócitos, o cromoglicato de sódio, modificaria as alterações observadas na matriz extracelular, na inflamação no tecido adiposo e nas alterações metabólicas sistêmicas durante o ciclo de perda e reganho de peso. Em nossos resultados notamos que o cromoglicato durante o emagrecimento não acelera a perda de peso, embora sua manutenção durante o período de reganho de peso realmente resulte em um menor ganho, conforme descrito anteriormente na literatura (LIU et al., 2009). Os

animais avaliados após as 16 semanas, tendo sido tratados com cromoglicato durante o período de emagrecimento, apresentam as mesmas características dos não-tratados ou seja, a melhora metabólica (glicemia basal e KIIT), a expressão de leptina, IL-6, MCP-1 e PAI-1 no tecido adiposo são idênticas aos animais que emagreceram sem tratamento. No entanto, o infiltrado de leucócitos e macrófagos na fração estromal vascular foi reduzido nos animais tratados com o cromoglicato. Em estudo prévio, o uso do cromoglicato de sódio, foi relatado como capaz de controlar o ganho de peso em camundongos, reduzir a adiposidade, melhorar metabolicamente, controlar a inflamação do tecido adiposo (reduzindo leptina, IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1), reduzir MMP-9, bem como reduzir o número de mastócitos próximos a microvasos no tecido adiposo. Estas ações parecem estar relacionadas a alterações no remodelamento tecidual e na influência que mastócitos possam ter na formação de microvasos e em processos de apoptose nos adipócitos (LIU et al., 2009).

Em nosso trabalho observamos uma redução da MMP-12 que como relatado anteriormente se manteve elevada após a perda de peso, sugerindo que mastócitos possam interferir com o remodelamento tecidual durante o período de perda de peso. A MMP-12 é denominada elastase de macrófagos e é expressa no tecido adiposo tanto nos adipócitos como no estroma vascular (BAUTERS; VAN HUL; LIJNEN, 2013; MAQUOI et al., 2002). Sabe-se que a MMP-12 está fortemente associada com o infiltrado de macrófagos em situações inflamatórias. Desta forma, podemos associar a redução da população de macrófagos com a redução da expressão de MMP-12 e, ainda, podemos sugerir a modulação da migração de macrófagos pelos mastócitos durante o emagrecimento, pois camundongos obesos tratados com cromoglicato apresentam uma redução do número de macrófagos no tecido adiposo, sem modificações no número de mastócitos (LIU et al., 2009). No entanto, quando os animais foram submetidos ao processo de reengorda, a fração estromal vascular do tecido adiposo visceral de animais tratados com cromoglicato apresentou um número maior de leucócitos e macrófagos, novamente não corroborando os dados de literatura (LIU et al., 2009).

A avaliação dos animais que reengordaram sob efeito do tratamento com o cromoglicato revelou peso corporal reduzido em comparação aos animais que reengordaram sem tratamento e, mostrou que a diferença entre os estoques de tecido adiposo não atinge diferenças estatisticamente significativas, exceto para o peso do fígado, que foi menor no grupo tratado. Estes animais também não apresentaram valores de glicemia de jejum e a constante do teste de tolerância à insulina diferentes estatisticamente dos animais não tratados. Desta forma,

nossos resultados não reproduzem o único relato de literatura de que o cromoglicato teria um efeito benéfico na obesidade (*in vivo*) (LIU et al., 2009).

Um trabalho com células CD117+ isoladas de tecido adiposo mostrou que estas eram capazes de produzir mais mediadores inflamatórios quando obtidas de indivíduos obesos (DIVOUX et al., 2012) e que células cultivadas em matriz de colágeno eram mais responsivas que células cultivadas em Matrigel, sugerindo que um ambiente fibrótico seja importante na ativação destas (DIVOUX et al., 2012). A produção de citocinas, adipocinas e MMPs pelo tecido adiposo visceral de animais tratados com cromoglicato não diferiu daquela registrada para animais não tratados, sugerindo que mastócitos não participem diretamente do processo de remodelamento do tecido adiposo.

Nossa abordagem adicional visando compreender as alterações de matriz extracelular decorrentes da obesidade e dos ciclos de peso, incluiu o uso de um inibidor de MMPs - o GM6001. O GM6001 é um potente inibidor de colagenases como a MMP-1 e MMP-8 e de gelatinases como a MMP-2 e MMP-9 (GALARDY et al., 1994). Novamente, animais tratados com o GM6001 durante o período de emagrecimento foram estudados em relação ao remodelamento tecidual, a inflamação no tecido adiposo, bem como as alterações metabólicas sistêmicas durante os ciclos de perda e ganho de peso. Como relatado no presente estudo, a restrição calórica moderada leva a perda de peso nos animais que se tornaram obesos pela manutenção da dieta hiperlipídica durante 8 semanas. O tratamento simultâneo com o GM6001, não modifica a perda de peso, nem a adiposidade (avaliada pela pesagem dos estoques de tecido adiposo) ou composição corporal após o emagrecimento. A avaliação da homeostase glicêmica indica que os animais que emagreceram apresentaram uma reversão parcial da resistência periférica à insulina, pois apresentam valores glicêmicos basais e o decaimento da curva glicêmica frente à administração de insulina diferentes dos obesos, mas também diferentes dos animais magros. Neste caso, novamente, o tratamento com o GM não modifica esta resposta, mas foi capaz de resultar em níveis mais baixos de insulina basal sérica. Os níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicérides encontram-se reduzidos com o emagrecimento, mas ainda diferentes do observado nos animais magros. O tratamento com o GM foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total e triglicérides tornando-os indiferentes dos animais magros sugerindo um efeito benéfico do GM durante o ciclo de perda de peso.

O gasto energético, avaliado por calorimetria indireta, indica que os animais obesos possuem uma redução do gasto energético e que não é revertido com o emagrecimento. Curiosamente, o tratamento com o GM reduz ainda mais este parâmetro. Os ciclos de peso, a

perda e ganho de peso corporal, são caracterizados pela adaptação metabólica à perda de peso, contribuindo para a capacidade de sobrevivência de organismo aos períodos de falta de alimento. No entanto, na sociedade moderna, estes efeitos acabam sendo deletérios para aqueles indivíduos que fazem dietas restritivas e voltam a ganhar peso, conhecidos como indivíduos “iô-iô” (BOSY-WESTPHAL et al., 2015). Nestes, observa-se um aumento de risco metabólico associado à obesidade e o reganho de peso. Ciclos de peso geram alterações na distribuição corporal em humanos, alterando as relações entre a proporção de massa magra e massa gorda, a proporção entre a massa de órgãos e a muscular, diferenças entre estoques de tecido adiposo e deposição ectópica de gordura e no nível molecular da composição corporal (glicogênio, proteína, água e gordura), alterando assim o padrão de gasto energético (BOSY-WESTPHAL et al., 2015). Um estudo recente com jovens obesos submetidos a regimes restritivos para a perda de peso e que ganharam peso espontaneamente, mostrou que o reganho de peso não alterou a distribuição ou a composição da massa magra, mas quando comparado a voluntário que mantiveram seu peso estável, observou-se uma redução no gasto calórico basal com a perda de peso (*resting energy expenditure – REE*; (BOSY-WESTPHAL et al., 2013)), o que dificulta a perda de peso principalmente em mulheres e aumenta a propensão ao reganho. Desta forma, sugerimos que a redução do gasto energético dos animais tratados com o GM pode ser decorrente da uma baixa oferta de substâncias energéticas durante o período de emagrecimento pois estes animais também apresentaram redução de glicemia, colesterol e triglicerídes.

A expressão das MMP-2, 3, 8 pró-MMP-9 e MMP-12 se encontra aumentada no tecido adiposo de animais obesos e a expressão de MMP-2 e 12 não é restaurada aos níveis observados nos animais magros após a perda de peso. A realização da zimografia, ensaio em que um gel é preparado com gelatina sendo capaz de detectar a ação de gelatinases, mostrou uma intensa atividade de MMP-2 e 9 nos animais que passaram pelo processo de emagrecimento e, como já esperado, o tratado com o GM mostrou a inibição destas MMPs, acompanhado de um aumento da expressão de colágeno IV e laminina detectado por Western blot em extratos proteicos obtidos do tecido adiposo. O colágeno IV e a laminina compõem a lamina basal de tecidos. A laminina dá ancoragem à superfície celular e então, permite o acúmulo de colágeno IV e outros componentes da lamina basal (YURCHENCO, 2011). Dentre as principais funções da MMP-2 e 9, podemos destacar a degradação de laminina e de colágeno IV (NABESHIMA et al., 2002), e ainda, a MMP-2 desempenha um papel importante no agrupamento de adipócitos (BROWN et al., 1997). A organização dos adipócitos em

aglomerados esféricos requer acumulação no espaço extracelular de componentes suficientes para gerar uma lâmina basal circundante (ZANGANI et al., 1999). A ação destas MMPs pode gerar descontinuidade ou a perda de estrutura da lamina basal, favorecendo a formação de “canais” que permitem a migração celular (ALEXANDROVA, 2008). Nossos dados são consistentes com um estudo anterior, em que o GM6001 foi capaz de inibir a atividade de MMP-2 e MMP-9 em tecido adiposo subcutâneo e gonadal de camundongos obesos, gerando uma maior quantidade de colágeno e contendo a expansão do tecido adiposo (LIJNEN et al., 2002). Por outro lado, quando avaliamos o conteúdo de colágeno pelo método de Sirius Red, o tratamento com o GM6001 foi capaz de reduzir o conteúdo de colágeno fibrilar total no tecido adiposo após o emagrecimento. Os componentes da matriz extracelular são sintetizados e degradados durante a diferenciação celular e que esta diferenciação em adipócitos, está associada com um aumento da secreção de componentes da membrana basal, tais como laminina, proteoglicanos e colágeno tipo IV e a diminuição da secreção de colágeno fibrilar tipo I (LIJNEN et al., 2002). O tratamento com o GM6001 tem sido associado a redução de fibrose em outros modelos experimentais (WANG, G. L. et al., 2008). O acúmulo excessivo de colágeno gera rigidez da matriz extracelular e esta condição fibrótica se dá como consequência da inflamação segundo alguns relatos, prejudicando a expansão do tecido adiposo (SUN et al., 2013). Um estudo recente avaliou o tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos e pacientes com câncer sem ou com cachexia e importante perda de peso e, demonstrou que a perda de peso resulta em um intenso remodelamento no tecido adiposo (BATISTA et al., 2016). Neste trabalho, os autores ainda mostraram a presença de adipócitos pequenos, atrofia do tecido adiposo e um quadro de fibrose, com presença aumentada de colágeno ao redor dos adipócitos (BATISTA et al., 2016). O tecido adiposo visceral dos animais tratados com GM apresentou uma fração maior de células com tamanho reduzido. A expressão de C/EPB α parece estar aumentada em indivíduos após um ciclo de restrição calórica (AUBIN et al., 2004), sendo que este fator é considerado um estimulante de adipogênese mas que não permite o crescimento das células (WANG, G. L. et al., 2008), o que poderia justificar a presença de adipócitos de menor tamanho nos animais que emagreceram e que o bloqueio de MMPs poderia estar intensificando estas respostas.

O tratamento com GM6001 foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α e MCP-1 no tecido adiposo após a perda de peso. Como já dissemos, a expressão de MCP-1 ocorre em vários tipos celulares e é regulada por diversos fatores, sendo aumentada a expressão em adipócitos, principalmente de estoques viscerais, durante a inflamação local associada à

obesidade e apontada como responsável pelo recrutamento de macrófagos (PANEE, 2012). Entretanto, a administração de MCP-1 a camundongos foi capaz de induzir resistência à insulina e a administração de um antagonista de CCR2 (receptor da MCP-1) foi capaz de reverter este efeito, mas sem afetar a migração de macrófagos para o tecido adiposo, sugerindo que esta quimiocina possa ter ações que interferem com a resistência à insulina não relacionadas ao recrutamento de macrófagos (TATEYA et al., 2010). Nossos resultados mostraram que embora a fração estroma vascular obtida por grama de tecido adiposo visceral dos animais tratados com GM6001 tenha sido maior sugerindo uma grande alteração da celularidade, bem como o número de leucócitos foi maior, o número de macrófagos é relativamente menor neste infiltrado, indicando que a menor produção de MCP-1 possa estar interferindo nas características do infiltrado inflamatório.

Parte dos animais tratados com o inibidor de MMPs durante o período de emagrecimento foi submetido ao reganho de peso com a reintrodução da dieta hiperlipídica *ad libitum*. Nota-se que após 8 semanas, os animais estão novamente obesos, chegando ao peso dos animais que se mantiveram durante 24 semanas em dieta hiperlipídica. O ganho de peso não foi diferente estatisticamente nos animais que emagreceram com ou sem tratamento com GM. No entanto, a avaliação da composição corporal mostra uma redução significativa do peso do fígado e uma tendência a redução do tecido adiposo epididimal quando corrigido pelo peso corporal nos animais que emagreceram com o tratamento com o GM quando comparado aos não-tratados. O nível glicêmico de jejum estava significativamente melhor nos animais que emagreceram tratados com o GM, bem como o decaimento da curva glicêmica frente à administração de insulina foi melhor nestes animais, embora os níveis séricos de insulina estejam altas e muito variáveis. Os níveis séricos de triglicérides e de LDL estavam com valores semelhantes aos animais que sempre foram magros neste grupo que reengordou após ter emagrecido com tratamento com GM. Esta melhora no controle glicêmico e na lipídemia não parece ser decorrente de alterações no gasto energético, que mostra valores semelhantes para todos os grupos avaliados. Sabe-se que os níveis séricos de colesterol são regulados pela absorção enteral, secreção biliar e síntese hepática. Colesterol na forma livre é mais facilmente incorporado aos ácidos biliares para absorção no intestino delgado, enquanto os ésteres de colesterol precisam ser convertidos a colesterol para que possam ser incorporados às micelas de sais biliares (DUAN et al., 2006). Não há relatos prévios se a inibição de MMPs poderia alterar processos absorptivos de lípidos no intestino, mas a permeabilidade intestinal é bastante alterada pela ação das MMPs (ALTSHULER et al., 2014). Desta forma, começamos a

considerar que vias de absorção, metabolismo e excreção de colesterol pudessem ter sido alteradas a longo prazo e poderiam justificar o efeito hipolipemiante do GM mesmo após o período de reganho de peso.

Trabalhos recentes demonstraram que o mesilato de imatinib, um inibidor seletivo de tirosina quinase utilizado no tratamento de doenças proliferativas como a leucemia mielóide crônica, apresenta a capacidade de reduzir os níveis séricos de colesterol em pacientes com hiperlipidemia (GOLOGAN et al., 2009; LASSILA et al., 2004). Adicionalmente, o imatinib reduz a atividade de MMP-2 no fígado (NEEF et al., 2006) e atividade e secreção de MMP-2 e MMP-9 em macrófagos (GACIC et al., 2016). O efeito do imatinib parece estar relacionado a uma ação pós-traducional, pois a expressão de vários genes não foi alterada neste estudo (GACIC et al., 2016) bem como no envolvimento da inibição da fosforilação de resíduos de tirosina no receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) que afetaria processos como a degradação de proteases e o metabolismo de colesterol. Adicionalmente, o imatinib parece aumentar os níveis séricos de adiponectina, o que também poderia contribuir para a melhora da resistência à insulina em pacientes com leucemia mielóide crônica (FITTER et al., 2010). As estatinas são drogas de baixo peso molecular que inibem a enzima HMG-CoA e aprovadas como drogas hipolipemiantes. Curiosamente, entre os efeitos pleiotrópicos das estatinas, ou seja, seus efeitos biológicos não-relacionados ao colesterol, também figura a capacidade de inibir MMPs (MANNELLO; TONTI, 2009) e outras ações anti-inflamatórias. Ou seja, num primeiro momento, nossa hipótese foi que o controle dos níveis séricos de colesterol e triglicérides pudesse ser uma ação do GM6001 não relacionada a sua atividade inibidora de MMPs. No entanto, não descartamos que as MMPs de alguma forma controlam a biodisponibilidade de colesterol por mecanismos ainda não compreendidos, pois curiosamente há outros exemplos de fármacos citados (imatinib e estatinas) que guardam ambas as atividades (MANNELLO; TONTI, 2009). A restrição calórica associada a um menor aporte de lipídeos biodisponíveis estaria resultando na redução adicional do metabolismo energético dos animais, como um mecanismo adaptativo e protetor.

Neste trabalho, a expressão de MMP-2, 3 e 12 no tecido adiposo visceral permanece alta nos animais obesos. A expressão de MMP-2, 8, pro-9 e 12 foi ainda maior nos animais submetidos ao reganho de peso e os que reengordaram com o GM apresentaram redução de MMP-2 e MMP-12 quando comparado aos não-tratados. No entanto, a realização do ensaio de zimografia não evidenciou diferenças na atividade de gelatinases e o ensaio de Sirius Red revelou redução do conteúdo de colágeno fibrilar total com o reganho de peso, independente do

tratamento com o GM. Além disso, os animais que foram tratados com o GM6001 (durante o período de emagrecimento) e reengordaram com dieta hiperlipídica tiveram redução da expressão de IL-6 e TNF- α , que são considerados marcadores de macrófagos com fenótipo M1, e aumento de adiponectina e IL-10, marcadores de macrófagos com fenótipo M2, justificando a melhora metabólica observada e, sugerindo assim, que a produção de citocinas pelo tecido adiposo pode estar associada ao remodelamento da matriz extracelular durante a ciclagem de peso.

A distribuição dos adipócitos em função de sua área mostra diferenças entre os animais obesos e magros e, os que passaram pelos ciclos de peso apresentam uma fração maior de adipócitos de menor área, mas também de maior área quando comparados aos obesos, mas sem variações entre animais emagrecidos tratados ou não com o GM como já citado anteriormente. Um trabalho prévio com voluntários humanos que foram submetidos a ciclos de perda e ganho de peso e passaram por uma avaliação de expressão gênica ao fim do período de perda e também do período de ganho, mostrou que após o ganho de peso, a expressão de C/EBP α é inibida. E este fator é considerado um estimulante de adipogênese mas inibidor do crescimento de adipócitos, enquanto a expressão de PPAR- γ estava aumentada, sendo este considerado um estimulante de adipogênese mas também estimulante da captação de lipídeos, indicando que o ganho de peso poderia permitir um maior acúmulo de lipídeos nos adipócitos facilitando a aquisição de massa gorda (LAGERPUSCH et al., 2013). Isso poderia explicar a presença de uma fração de adipócitos com área pequena (fruto de adipogênese recente), mas também adipócitos grandes que estariam incorporando lipídeos.

Considerando que os animais foram tratados com o GM6001 somente durante o período de perda de peso e, desta forma o início do período de ganho de peso ocorreu num ambiente modificado (com redução do tamanho dos adipócitos, de fibrose e inflamação no tecido adiposo), o que conseqüentemente contribuiu para melhora glicêmica e lipidêmica que estão classicamente alterados durante a obesidade, podemos sugerir que o remodelamento da matriz extracelular se faz importante na compreensão dos mecanismos envolvidos ao efeito sanfona, mas a partir de nossos resultados não podemos afirmar se o GM6001 reduziu a inflamação e conseqüentemente contribuiu para redução da fibrose ou se o GM6001 teve uma ação direta sobre a fibrose, o que reduziria a inflamação no tecido adiposo.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por meio deste trabalho conclui-se que (FIGURA 25):

- A perda de peso em camundongos não restaura as alterações metabólicas e a inflamação no tecido adiposo induzidos pela obesidade sendo este período caracterizado por uma intensa atividade de remodelamento da matriz extracelular. O reganho de peso não acrescenta efeitos deletérios aos já observados pela manutenção da obesidade. O sequencia de indução da obesidade, restrição calórica e reintrodução da dieta hiperlipídica mostrou-se um modelo eficiente para estudos de ciclagem de peso.
- A estabilização de mastócitos com o cromoglicato de sódio durante a perda/reganho de peso causa alterações no infiltrado de leucócitos e macrófagos no tecido adiposo visceral, mas não no perfil de MMPs, citocinas inflamatórias ou nos parâmetros metabólicos. Desta forma podemos sugerir que mastócitos possam modular o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo visceral durante a ciclagem de peso, mas não interferem com o processo inflamatório ou com a matriz extracelular.
- A inativação das MMPs com o GM6001 durante a perda de peso resultou em melhoras metabólicas e inflamatórias no tecido adiposo visceral mesmo após o reganho de peso, além de interferir com o tamanho dos adipócitos, que ao final do período de reganho de peso apresentaram uma quantidade menor de adipócitos com tamanho aumentado. Assim, podemos sugerir que a inativação das MMPs interferem com o remodelamento da matriz extracelular durante a expansão/regressão do tecido adiposo e que esta inativação poderia contribuir para melhora dos efeitos deletérios associados ao “efeito sanfona”.

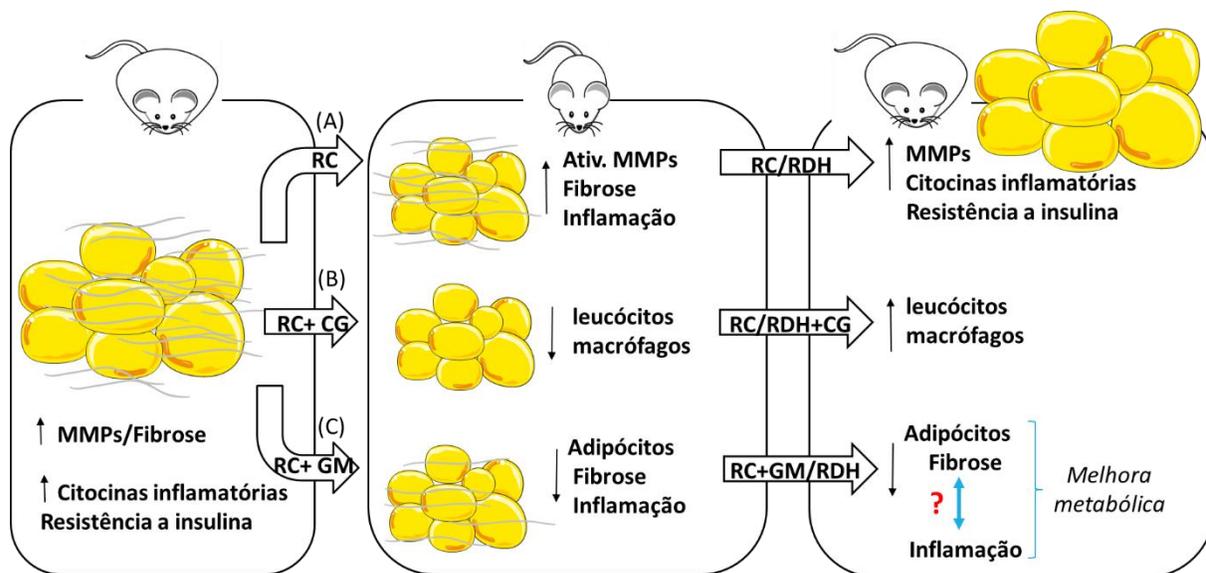


FIGURA 25: Ação do cromoglicato de sódio e do GM6001 sobre as alterações metabólicas, inflamatórias e no perfil de MMPs durante os ciclos de perda e reganho de peso. (A) A atividade das MMPs é mais intensa na perda do que no reganho de peso, e está associada ao aumento de fibrose e a atividade inflamatória que não é restabelecida após a perda de peso. (B) A estabilização de mastócitos com o cromoglicato de sódio não altera o perfil de MMPs, citocinas e parâmetros metabólicos, mas causa alterações no infiltrado de leucócitos e macrófagos, sugerindo que mastócitos possam modular o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo visceral durante a ciclagem de peso. (C) A inativação das MMPs com o GM6001 durante a perda de peso interfere com o remodelamento do tecido adiposo e com a resposta inflamatória, resultando em melhora metabólica mesmo após o reganho de peso. A ação do GM6001 pode ser decorrente da redução da inflamação, o que reduziria a fibrose, ou vice-versa.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.J.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1463p.

ALEXANDROVA, A. Y. Evolution of cell interactions with extracellular matrix during carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73, n. 7, p. 733-741, 2008.

ALTSHULER, A. E.; LAMADRID, I.; LI, D.; MA, S. R.; KURRE, L.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W.; PENN, A. H. Transmural intestinal wall permeability in severe ischemia after enteral protease inhibition. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96655, 2014.

ANDERSON, E. K.; GUTIERREZ, D. A.; KENNEDY, A.; HASTY, A. H. Weight cycling increases T-cell accumulation in adipose tissue and impairs systemic glucose tolerance. **Diabetes**, v. 62, n. 9, p. 3180-3188, 2013.

ATHYROS, V. G.; TZIOMALOS, K.; KARAGIANNIS, A.; ANAGNOSTIS, P.; MIKHAILIDIS, D. P. Should adipokines be considered in the choice of the treatment of obesity-related health problems? **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 122-135, 2010.

AUBIN, D.; GAGNON, A.; GRUNDER, L.; DENT, R.; ALLEN, M.; SORISKY, A. Adipogenic and antiapoptotic protein levels in human adipose stromal cells after weight loss. **Obes Res**, v. 12, n. 8, p. 1231-1234, 2004.

AZHAR, Y.; PARMAR, A.; MILLER, C. N.; SAMUELS, J. S.; RAYALAM, S. Phytochemicals as novel agents for the induction of browning in white adipose tissue. **Nutr Metab (Lond)**, v. 13, p. 89, 2016.

BARBOSA-DA-SILVA, S.; DA SILVA, N. C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. **Hepatol Res**, 2013.

BARBOSA-DA-SILVA, S.; FRAULOB-AQUINO, J. C.; LOPES, J. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39837, 2012.

BATISTA, M. L., JR.; HENRIQUES, F. S.; NEVES, R. X.; OLIVAN, M. R.; MATOS-NETO, E. M.; ALCANTARA, P. S.; MAXIMIANO, L. F.; OTOCH, J. P.; ALVES, M. J.; SEELAENDER, M. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 7, n. 1, p. 37-47, 2016.

BAUTERS, D.; VAN HUL, M.; LIJNEN, H. R. Macrophage elastase (MMP-12) in expanding murine adipose tissue. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 4, p. 2954-2959, 2013.

BLACKBURN, G. L.; WILSON, G. T.; KANDERS, B. S.; STEIN, L. J.; LAVIN, P. T.; ADLER, J.; BROWNELL, K. D. Weight cycling: the experience of human dieters. **Am J Clin Nutr**, v. 49, n. 5 Suppl, p. 1105-1109, 1989.

BOSY-WESTPHAL, A.; KAHLHOFER, J.; LAGERPUSCH, M.; SKURK, T.; MULLER, M. J. Deep body composition phenotyping during weight cycling: relevance to metabolic efficiency and metabolic risk. **Obes Rev**, v. 16 Suppl 1, p. 36-44, 2015.

BOSY-WESTPHAL, A.; SCHAUTZ, B.; LAGERPUSCH, M.; POURHASSAN, M.; BRAUN, W.; GOELE, K.; HELLER, M.; GLUER, C. C.; MULLER, M. J. Effect of weight loss and regain on adipose tissue distribution, composition of lean mass and resting energy expenditure in young overweight and obese adults. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 10, p. 1371-1377, 2013.

BOUCKENOOGHE, T.; SISINO, G.; AURIENTIS, S.; CHINETTI-GBAGUIDI, G.; KERR-CONTE, J.; STAELS, B.; FONTAINE, P.; STORME, L.; PATTOU, F.; VAMBERGUE, A. Adipose tissue macrophages (ATM) of obese patients are releasing increased levels of prolactin during an inflammatory challenge: a role for prolactin in diabetes? **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 4, p. 584-593, 2014.

BOULOUMIE, A.; SENGENES, C.; PORTOLAN, G.; GALITZKY, J.; LAFONTAN, M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2080-2086, 2001.

BOUTENS, L.; STIENSTRA, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 879-894, 2016.

BROWN, L. M.; FOX, H. L.; HAZEN, S. A.; LANOUE, K. F.; RANNELS, S. R.; LYNCH, C. J. Role of the matrixin MMP-2 in multicellular organization of adipocytes cultured in basement membrane components. **Am J Physiol**, v. 272, n. 3 Pt 1, p. C937-949, 1997.

BUECHLER, C.; KRAUTBAUER, S.; EISINGER, K. Adipose tissue fibrosis. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 548-553, 2015.

CATALAN, V.; GOMEZ-AMBROSI, J.; RODRIGUEZ, A.; RAMIREZ, B.; ROTELLAR, F.; VALENTI, V.; SILVA, C.; GIL, M. J.; SALVADOR, J.; FRUHBECK, G. Increased tenascin C and Toll-like receptor 4 levels in visceral adipose tissue as a link between inflammation and extracellular matrix remodeling in obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 10, p. E1880-1889, 2012.

CHABOT, K.; GAUTHIER, M. S.; GARNEAU, P. Y.; RABASA-LHORET, R. Evolution of subcutaneous adipose tissue fibrosis after bariatric surgery. **Diabetes Metab**, 2016.

CHAVEY, C.; MARI, B.; MONTHOUËL, M. N.; BONNAFOUS, S.; ANGLARD, P.; VAN OBERGHEN, E.; TARTARE-DECKERT, S. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 14, p. 11888-11896, 2003.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; KIM, J. I.; KIM, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 30, 2016.

CHUN, T. H. Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. **Adipocyte**, v. 1, n. 2, p. 89-95, 2012.

DANKEL, S. N.; DEGERUD, E. M.; BORKOWSKI, K.; FJAERE, E.; MIDTBO, L. K.; HAUGEN, C.; SOLSVIK, M. H.; LAVIGNE, A. M.; LIASET, B.; SAGEN, J. V.; KRISTIENSEN, K.; MELLGREN, G.; MADSEN, L. Weight cycling promotes fat gain and altered clock gene expression in adipose tissue in C57BL/6J mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2013.

DEMEULEMEESTER, D.; COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on adipose tissue development. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, n. 1, p. 105-110, 2005.

DIVOUX, A.; MOUTEL, S.; POITOU, C.; LACASA, D.; VEYRIE, N.; AISSAT, A.; AROCK, M.; GUERRE-MILLO, M.; CLEMENT, K. Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 9, p. E1677-1685, 2012.

DRANSE, H. J.; MURUGANANDAN, S.; FAWCETT, J. P.; SINHAL, C. J. Adipocyte-secreted chemerin is processed to a variety of isoforms and influences MMP3 and chemokine secretion through an NFkB-dependent mechanism. **Mol Cell Endocrinol**, 2016.

DUAN, L. P.; WANG, H. H.; OHASHI, A.; WANG, D. Q. Role of intestinal sterol transporters Abcg5, Abcg8, and Npc1l1 in cholesterol absorption in mice: gender and age effects. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 2, p. G269-276, 2006.

ERIKSSON-HOGLING, D.; ANDERSSON, D. P.; BACKDAHL, J.; HOFFSTEDT, J.; ROSSNER, S.; THORELL, A.; ARNER, E.; ARNER, P.; RYDEN, M. Adipose tissue morphology predicts improved insulin sensitivity following moderate or pronounced weight loss. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, n. 6, p. 893-898, 2015.

FITTER, S.; VANDYKE, K.; SCHULTZ, C. G.; WHITE, D.; HUGHES, T. P.; ZANNETTINO, A. C. Plasma adiponectin levels are markedly elevated in imatinib-treated chronic myeloid leukemia (CML) patients: a mechanism for improved insulin sensitivity in type 2 diabetic CML patients? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 8, p. 3763-3767, 2010.

FU, C.; JIANG, Y.; GUO, J.; SU, Z. Natural Products with Anti-obesity Effects and Different Mechanisms of Action. **J Agric Food Chem**, v. 64, n. 51, p. 9571-9585, 2016.

GACIC, J.; VORKAPIC, E.; OLSEN, R. S.; SODERBERG, D.; GUSTAFSSON, T.; GEFFERS, R.; SKOGLUND, K.; MATUSSEK, A.; WAGSATER, D. Imatinib reduces cholesterol uptake and matrix metalloproteinase activity in human THP-1 macrophages. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 1, p. 1-6, 2016.

GAGNON, A.; YARMO, M. N.; LANDRY, A.; SORISKY, A. Macrophages alter the differentiation-dependent decreases in fibronectin and collagen I/III protein levels in human preadipocytes. **Lipids**, v. 47, n. 9, p. 873-880, 2012.

GALARDY, R. E.; GROBELNY, D.; FOELLMER, H. G.; FERNANDEZ, L. A. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. **Cancer Res**, v. 54, n. 17, p. 4715-4718, 1994.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacol Ther**, v. 133, n. 3, p. 257-279, 2012.

GHOSH, A. K.; VAUGHAN, D. E. PAI-1 in tissue fibrosis. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 2, p. 493-507, 2012.

GOLOGAN, R.; CONSTANTINESCU, G.; GEORGESCU, D.; OSTROVEANU, D.; VASILACHE, D.; DOBREA, C.; IANCU, D.; POPOV, V. Hypolipemiant besides antileukemic effect of imatinib mesylate. **Leuk Res**, v. 33, n. 9, p. 1285-1287, 2009.

HALAAS, J. L.; GAJIWALA, K. S.; MAFFEI, M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R. L.; BURLEY, S. K.; FRIEDMAN, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 543-546, 1995.

HENEGAR, C.; TORDJMAN, J.; ACHARD, V.; LACASA, D.; CREMER, I.; GUERRE-MILLO, M.; POITOU, C.; BASDEVANT, A.; STICH, V.; VIGUERIE, N.; LANGIN, D.; BEDOSSA, P.; ZUCKER, J. D.; CLEMENT, K. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. **Genome Biol**, v. 9, n. 1, p. R14, 2008.

HIRAI, S.; OHYANE, C.; KIM, Y. I.; LIN, S.; GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; KIM, C. S.; KANG, J.; YU, R.; KAWADA, T. Involvement of mast cells in adipose tissue fibrosis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2013.

HOPPS, E.; CAIMI, G. Matrix metalloproteinases in metabolic syndrome. **Eur J Intern Med**, v. 23, n. 2, p. 99-104, 2012.

HUANG, G.; GREENSPAN, D. S. ECM roles in the function of metabolic tissues. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 1, p. 16-22, 2012.

JAOUDE, J.; KOH, Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. **Vasc Health Risk Manag**, v. 12, p. 287-295, 2016.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.

KANG, Y. E.; KIM, J. M.; JOUNG, K. H.; LEE, J. H.; YOU, B. R.; CHOI, M. J.; RYU, M. J.; KO, Y. B.; LEE, M. A.; LEE, J.; KU, B. J.; SHONG, M.; LEE, K. H.; KIM, H. J. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154003, 2016.

KARMALI, S.; BRAR, B.; SHI, X.; SHARMA, A. M.; DE GARA, C.; BIRCH, D. W. Weight recidivism post-bariatric surgery: a systematic review. **Obes Surg**, v. 23, n. 11, p. 1922-1933, 2013.

KEOPHIPHATH, M.; ACHARD, V.; HENEGAR, C.; ROUAULT, C.; CLEMENT, K.; LACASA, D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. **Mol Endocrinol**, v. 23, n. 1, p. 11-24, 2009.

KHAN, T.; MUISE, E. S.; IYENGAR, P.; WANG, Z. V.; CHANDALIA, M.; ABATE, N.; ZHANG, B. B.; BONALDO, P.; CHUA, S.; SCHERER, P. E. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 6, p. 1575-1591, 2009.

KROEGER, C. M.; HODDY, K. K.; VARADY, K. A. Impact of weight regain on metabolic disease risk: a review of human trials. **J Obes**, v. 2014, p. 614519, 2014.

LAGERPUSCH, M.; ENDERLE, J.; EGGELING, B.; BRAUN, W.; JOHANNSEN, M.; PAPE, D.; MULLER, M. J.; BOSY-WESTPHAL, A. Carbohydrate quality and quantity affect glucose and lipid metabolism during weight regain in healthy men. **J Nutr**, v. 143, n. 10, p. 1593-1601, 2013.

LASSILA, M.; ALLEN, T. J.; CAO, Z.; THALLAS, V.; JANDELEIT-DAHM, K. A.; CANDIDO, R.; COOPER, M. E. Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 5, p. 935-942, 2004.

LAUTERBACH, M. A.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Arch**, 2017.

LEE, M. J.; WU, Y.; FRIED, S. K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 4, p. 371-376, 2010.

LIJNEN, H. R.; MAQUOI, E.; HANSEN, L. B.; VAN HOEF, B.; FREDERIX, L.; COLLEN, D. Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 3, p. 374-379, 2002.

LIN; CHUN, T. H.; KANG, L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. **Biochem Pharmacol**, 2016.

LIST, E. O.; BERRYMAN, D. E.; WRIGHT-PIEKARSKI, J.; JARA, A.; FUNK, K.; KOPCHICK, J. J. The effects of weight cycling on lifespan in male C57BL/6J mice. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 8, p. 1088-1094, 2013.

LIU, J.; DIVOUX, A.; SUN, J.; ZHANG, J.; CLEMENT, K.; GLICKMAN, J. N.; SUKHOVA, G. K.; WOLTERS, P. J.; DU, J.; GORGUN, C. Z.; DORIA, A.; LIBBY, P.; BLUMBERG, R. S.; KAHN, B. B.; HOTAMISLIGIL, G. S.; SHI, G. P. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 940-945, 2009.

MACCOLL, E.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 355, n. 3, p. 410-428, 2015.

MACLEAN, P. S.; HIGGINS, J. A.; GILES, E. D.; SHERK, V. D.; JACKMAN, M. R. The role for adipose tissue in weight regain after weight loss. **Obes Rev**, v. 16 Suppl 1, p. 45-54, 2015.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Statins and breast cancer: may matrix metalloproteinase be the missing link. **Cancer Invest**, v. 27, n. 4, p. 466-470, 2009.

MAQUOI, E.; MUNAUT, C.; COLIGE, A.; COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1093-1101, 2002.

MARIMAN, E. C.; WANG, P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 8, p. 1277-1292, 2010.

MCNEIL, H. P. The mast cell and inflammation. **Aust N Z J Med**, v. 26, n. 2, p. 216-225, 1996.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Int**, v. 52, n. 4, p. 255-264, 2002.

NEEF, M.; LEDERMANN, M.; SAEGESSER, H.; SCHNEIDER, V.; WIDMER, N.; DECOSTERD, L. A.; ROCHAT, B.; REICHEN, J. Oral imatinib treatment reduces early fibrogenesis but does not prevent progression in the long term. **J Hepatol**, v. 44, n. 1, p. 167-175, 2006.

NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNANDEZ-VELEDO, S.; DE ALVARO, C.; LORENZO, M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3211-3221, 2008.

OCHNER, C. N.; BARRIOS, D. M.; LEE, C. D.; PI-SUNYER, F. X. Biological mechanisms that promote weight regain following weight loss in obese humans. **Physiol Behav**, v. 120, p. 106-113, 2013.

OHMAN, M. K.; EITZMAN, D. T. Targeting MCP-1 to reduce vascular complications of obesity. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 164-176, 2009.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

PANEE, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. **Cytokine**, v. 60, n. 1, p. 1-12, 2012.

PIYA, M. K.; MCTERNAN, P. G.; KUMAR, S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. **J Endocrinol**, v. 216, n. 1, p. T1-T15, 2013.

ROSENBAUM, M.; NICOLSON, M.; HIRSCH, J.; MURPHY, E.; CHU, F.; LEIBEL, R. L. Effects of weight change on plasma leptin concentrations and energy expenditure. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 11, p. 3647-3654, 1997.

SHARMA, A.; ABRAHAM, T.; SAMPAIO, A.; COWAN, M.; UNDERHILL, M.; SCOTT, A. Sodium cromolyn reduces expression of CTGF, ADAMTS1, and TIMP3 and modulates post-injury patellar tendon morphology. **J Orthop Res**, v. 29, n. 5, p. 678-683, 2011.

SHIH, C. L.; AJUWON, K. M. Inhibition of MMP-13 prevents diet-induced obesity in mice and suppresses adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Mol Biol Rep**, v. 42, n. 7, p. 1225-1232, 2015.

SISMANOPOULOS, N.; DELIVANIS, D. A.; MAVROMMATI, D.; HATZIAGELAKI, E.; CONTI, P.; THEOHARIDES, T. C. Do mast cells link obesity and asthma? **Allergy**, v. 68, n. 1, p. 8-15, 2013.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 33-39, 2010.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 2011.

SUN, K.; TORDJMAN, J.; CLEMENT, K.; SCHERER, P. E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell Metab**, v. 18, n. 4, p. 470-477, 2013.

TALUKDAR, S.; OH, D. Y.; BANDYOPADHYAY, G.; LI, D.; XU, J.; MCNELIS, J.; LU, M.; LI, P.; YAN, Q.; ZHU, Y.; OFRECIO, J.; LIN, M.; BRENNER, M. B.; OLEFSKY, J. M. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1407-1412, 2012.

TANAKA, A.; NOMURA, Y.; MATSUDA, A.; OHMORI, K.; MATSUDA, H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 6, p. C1360-1367, 2011.

TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KAWAGUCHI, T.; KANDA, H.; KASUGA, M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 971-979, 2010.

VAN HUL, M.; LIJNEN, H. R. A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice. **J Thromb Haemost**, v. 6, n. 7, p. 1198-1206, 2008.

WANG, G. L.; SHI, X.; SALISBURY, E.; TIMCHENKO, N. A. Regulation of apoptotic and growth inhibitory activities of C/EBPalpha in different cell lines. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 7, p. 1626-1639, 2008.

WANG, J.; SHI, G. P. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 27, n. 8, p. 919-924, 2011.

WILLIAMS, A. S.; KANG, L.; WASSERMAN, D. H. The extracellular matrix and insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 7, p. 357-366, 2015.

YU, Y.; DENG, C.; HUANG, X. F. Obese reversal by a chronic energy restricted diet leaves an increased Arc NPY/AgRP, but no alteration in POMC/CART, mRNA expression in diet-induced obese mice. **Behav Brain Res**, v. 205, n. 1, p. 50-56, 2009.

YURCHENCO, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 2, 2011.

ZAMARRON, B. F.; MERGIAN, T. A.; CHO, K. W.; MARTINEZ-SANTIBANEZ, G.; LUAN, D.; SINGER, K.; DELPROPOSTO, J. L.; GELETKA, L. M.; MUIR, L. A.; LUMENG, C. N. Macrophage Proliferation Sustains Adipose Tissue Inflammation in Formerly Obese Mice. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 392-406, 2017.

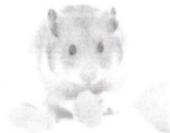
ZANGANI, D.; DARCY, K. M.; MASSO-WELCH, P. A.; BELLAMY, E. S.; DESOLE, M. S.; IP, M. M. Multiple differentiation pathways of rat mammary stromal cells in vitro: acquisition of a fibroblast, adipocyte or endothelial phenotype is dependent on hormonal and extracellular matrix stimulation. **Differentiation**, v. 64, n. 2, p. 91-101, 1999.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunol Lett**, v. 112, n. 2, p. 61-67, 2007.

ZHANG, H.; XUE, Y.; WANG, H.; HUANG, Y.; DU, M.; YANG, Q.; ZHU, M. J. Mast cell deficiency exacerbates inflammatory bowel symptoms in interleukin-10-deficient mice. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 27, p. 9106-9115, 2014.

8. ANEXO

8.1 Aprovação Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA



Bragança Paulista, 29 de Maio de 2014

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Ciclos de perda e reganho de pressão e camundongos: Avaliação do infiltrado de mastócitos, alterações vasculares, remodelamento tecidual e mediadores de resolução do processo inflamatório.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Profa. Dra. Alessandra Gambero

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.05.2014

IP. CIUCA: 189.2.187.162

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa– CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 29/05/2014 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

Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
 Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
 Campus Campinas - Unidade Cambui
 Campus Campinas - Unidade Swift
 Campus Itatiba
 Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel. 11 2454 8000 / Fax 4034 1825
 R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambui - CEP 13024-001 / Tel. 19 3779 3370
 R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel. 19 3779 3300 / Fax 3779 3321
 R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel. 11 4534 8000 / Fax 4534 8015
 R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel. 11 3411 2950 / Fax 3411 2978