



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

NATÁLIA PEREIRA SILVA

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PPAR- γ NA MODULAÇÃO DA
DOR INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Limeira

2017



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



NATÁLIA PEREIRA SILVA

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PPAR- γ NA MODULAÇÃO DA DOR INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Nutrição à Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Co-orientador: Prof(a). Ms(a). Bruna de Melo Aquino

Limeira
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Si38e Silva, Natália Pereira, 1995-
Envolvimento dos receptores PPAR-[gama] na modulação da dor inflamatória em camundongos tratados com dieta hiperlipídica / Natália Pereira Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.
Coorientador: Bruna de Melo Aquino.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Dor. 2. PPAR gama. 3. Dieta hiperlipídica. I. Fusaro, Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira, 1979-. II. Aquino, Bruna de Melo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Involvement of PPAR-[gamma] receptors in modulation of inflammatory pain in mice treated with high-fat diet

Palavras-chave em inglês:

Pain

PPAR gamma

High-fat diet

Titulação: Bacharel em Nutrição

Banca examinadora:

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro [Orientador]

Bruna de Melo Aquino

Dennys Esper Corrêa Cintra

Data de entrega do trabalho definitivo: 22-11-2017

Autor: Natália Pereira Silva

Título: Envolvimento dos Receptores PPAR- γ na Modulação da Dor Inflamatória em Camundongos Tratados com Dieta Hiperlipídica

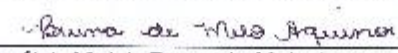
Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Nutrição

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 22 / 11 / 2014.

BANCA EXAMINADORA


Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)


Prof(a). Ms(a). Bruna de Melo Aquino – Coorientador(a)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)


Prof. Dr. Denny Esper Corrêa Cintra – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.


Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.

Mas tenho que querer o que for. O êxito está
em ter êxito, e não em ter condições de êxito.

Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Aos meus pais, grandes incentivadores do meu crescimento pessoal e profissional desde o princípio e até o infinito, todo meu sucesso poderia dedicar a vocês que em momento algum deixaram de apontar as minhas fraquezas, sempre me fazendo enxergá-las de forma a me direcionar para os melhores caminhos de enfrentá-las e vencê-las, e concomitantemente identificavam meus talentos e faziam a minha estrelinha brilhar e superar tudo o que pudesse em algum momento me desmotivar. Meu pai eu te agradeço por todos os momentos que me chamou atenção para a realidade que eu deveria enfrentar, me mostrando que com facilidade e comodidade nada flui e só conseguimos “vencer” quando entramos para “guerra” e que não devemos contar com plateia e aplausos, são consequências de todo o esforço e é natural e mais verdadeiro quando resultante de um desafio vencido por nós mesmos. Mãe te agradecer é muito pouco, uma grande mulher que tudo o que enfrentou ao longo da vida, só me transformou a cada dia, me espelhou a querer ser como você, uma mocinha que se tornou rainha, sabe todas aquelas lágrimas que você secou, me acolhendo em seu colo, sempre que eu me decepcionava ou que demonstrava o meu medo de decidir por algo novo, hoje elas escorrem para expressar minha felicidade de ter cumprido um ciclo e de poder, com boas expectativas aguardar pelos próximos que ainda virão. PAI e MÃE, insubstituíveis, os maiores amores da minha vida!

A TODOS os meus professores, a minha mais especial gratidão, em destaque coloco aqui os mestres e doutores que na faculdade me demonstraram a diferença de uma criança/adolescente para uma adulta, aquela facilidade do ensino fundamental e médio vinha deixando de existir para dar lugar a um conto de fadas da vida real, onde as responsabilidades superam tudo o que você possa imaginar. Sabe aquelas matérias fáceis, aquela apostila cheia de desenhos, a lousa lotada de esquemas que facilitavam todo entendimento e que bastava copiar e ler para a prova e tirar nota para não ficar de recuperação? Se transformou já no primeiro ano, em livros de mil páginas como o “GUYTON”, o “LENHINGER” e o “THE CELL”, a lousa passou a ser os 150 slides, piscou, conversou, perdeu a cópia! Sem me aprofundar muito, deixo as lembranças das noites acordadas para revisar a matéria da prova, as milhares de folhas de resumo, os imensos artigos em inglês, mas a satisfação de ter tido sempre bons resultados.

Em especial, o meu agradecimento a professora Maria Cláudia pela oportunidade de aprender muito em 2 anos de Iniciação Científica, experiências incríveis, muita superação, trabalho em grupo/família (LABEDI) que me permitiu um crescimento imenso como pessoa e mini-pesquisadora. Agradeço a Carolina, ao Diogo, a Graciana e a Bruna por todo suporte, pela paciência, pelos ensinamentos e conselhos.

Ressaltando, minha admiração e imenso prazer de ter sido co-orientada por você, Bruna, que além de ótima professora, é amiga e ainda é mãezona, obrigada pelas broncas e também pelo reconhecimento, por todas as suas correções e por não ter desistido de me ensinar com cada erro, ainda que bobo ou óbvio.

Bia, muito obrigada por ter se tornado a melhor amiga de IC que alguém poderia ter. Obrigada por dividir os sorrisos ao ver os nossos nomes na lista do PIBIC e também as lágrimas de desespero em época de escrever relatórios. Você é demais!!

As minhas melhores companhias de Limeira, Jeniffer, Victória, Thatiana, Giovanna, Julia declaro que essa amizade construída é para vida, ok? Vocês são muito importantes para mim, compartilhamos das festinhas, dos risos, dos choros, das conquistas e desistências, dos romances e das brigas. Passamos lado a lado pelos 4 aninhos de graduação, que voaram, e hoje estamos aqui para finalizá-los. Sem deixar para trás nenhuma de vocês, estão todas, para sempre grudadinhas no meu coração. Amo muito esse grupinho!!

SILVA, Natália Pereira. Envolvimento dos receptores PPAR- γ na modulação da dor inflamatória em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. 2017.46 folhas. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, 2017.

RESUMO

Sabe-se que os receptores PPAR fazem parte de uma família de receptores nucleares que regulam uma série de processos relacionados à homeostase lipídica e da glicose, sendo os receptores PPAR- γ importantes moduladores de diversos processos de natureza inflamatória e imunológica, incluindo a dor. Dados recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o consumo de dieta hiperlipídica por 3, 6 e 9 semanas é capaz de induzir hipoalgesia no modelo de dor inflamatória aguda induzida pela carragenina. Além disso, demonstramos que esta hipoalgesia não é mediada por receptores opióides periféricos. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o possível envolvimento dos receptores PPAR- γ periféricos e centrais na modulação da hipoalgesia em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Para isso, foram utilizados camundongos machos Swiss, provenientes do CEMIB/UNICAMP, sob parecer do CEUA (Comissão de Ética no Uso dos Animais, protocolo número 4256-1). Os animais foram divididos em 2 grupos, um alimentado com dieta padrão e outro com dieta hiperlipídica 45%. Para avaliar o envolvimento dos receptores PPAR- γ na hipoalgesia em animais tratados com dieta hiperlipídica, utilizamos o antagonista seletivo dos receptores PPAR- γ , o GW9662, administrado por via intraplantar ou intraperitoneal, 30 minutos antes da administração de carragenina (100 μ g/20 μ L), seguida 3 horas após pela serotonina (75 μ g/20 μ L). Para avaliação do comportamento doloroso foi utilizada uma caixa de observação espelhada 30x30 cm e foi mensurada a quantidade de flinchs (levantamento de pata) e tempo de coceira nos animais após receberem administração subcutânea de carragenina e serotonina. Verificamos que o pré-tratamento com GW9662, por via intraplantar, foi capaz de reverter a hipoalgesia em animais tratados com dieta hiperlipídica por 3, 6 e 9 semanas de dieta ($p < 0.05$, teste de Tukey, $n=5$). A administração de GW9662 na pata contralateral também reverteu essa resposta hipoalgésica induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica ($p < 0.05$, teste T, $n=5$), sugerindo um componente central nesta resposta. A administração intraperitoneal também foi capaz de reverter a hipoalgesia apenas em animais tratados por 9 semanas ($p < 0.05$, teste de Tukey, $n=5$). Esses resultados

sugerem que os receptores PPAR- γ periféricos e centrais estão envolvidos na modulação da hipoalgesia induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica e que a administração do antagonista por via periférica parece ser mais efetiva que a administração sistêmica.

Palavras chaves: hipoalgesia, receptores PPAR- γ , dieta hiperlipídica.

SILVA, Natália Pereira. Involvement of PPAR- γ receptors in modulation of inflammatory pain in mice treated with high-fat diet. 2017.46 folhas. Trabalho de conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, 2017.

ABSTRACT

It is well known that PPAR receptors are part of a family of nuclear receptors that regulate a number of processes related to lipid and glucose homeostasis, and PPAR- γ receptors are important modulators of several inflammatory and immunological processes, including pain. Recent results from our research group have demonstrated that the intake of high-fat diet for 3, 6 and 9 weeks was able to induce hypoalgesia in a model of acute inflammatory pain. In addition, we have also shown that this hypoalgesia is not mediated by peripheral opioid receptors. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of peripheral and central PPAR- γ receptors in the modulation of hypoalgesia in mice treated with high-fat diet. For this, Swiss male mice, from CEMIB/UNICAMP, were used, under approved of CEUA (Ethics Committee on the Use of Animals, protocol # 4256-1). The animals were separated into 2 groups, one that received a normal fat-diet and another that received 45% high-fat diet. To evaluate the involvement of PPAR- γ receptors in hypoalgesia induced by high-fat diet, we used the selective antagonist of the PPAR- γ receptor, GW9662, administered 30 minutes (subcutaneous or intraperitoneal) before carrageenan (100 μ g/20 μ L), followed 3 hours later by serotonin (75 μ g/20 μ L). To evaluate the nociceptive behavioral responses, we used a 30x30 cm mirrored observation box and the amount of flinches and time of itching in the animals after subcutaneous administration of carrageenan and serotonin. We verified that intraplantar pre-treatment with GW9662 was able to modulate the hypoalgesia in mice treated with high-fat diet for 3, 6 and 9 weeks ($P < 0.05$, Tukey test, $n = 5$) and that the administration of GW9662 in the contralateral paw also reversed this response ($p < 0.05$, T test), suggesting a central component in this response. Intraperitoneal administration was also able to reverse hypoalgesia, but only in animals treated for 9 weeks ($p < 0.05$, Tukey test, $n = 5$). These results suggest that peripheral and central PPAR- γ receptors are involved in the modulation of hypoalgesia induced by high-fat diet consumption and that peripheral administration is more effective than systemic administration.

Keywords: hypoalgesia, PPAR- γ receptors, high-fat diet.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição nutricional da dieta hiperlipídica de manutenção.....	24
-----------------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Dieta hiperlipídica induz hipoalgesia não mediada pelos receptores opióides periféricos.....	20
Figura 2 Envolvimento dos receptores PPAR- γ locais na hipoalgesia induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica.....	27
Figura 3 Envolvimento dos receptores PPAR- γ sistêmicos na hipoalgesia induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15d-PGJ₂	15-deoxy-(Delta12,14) - prostaglandin J ₂ (15-deoxy-(Delta12,14)-prostaglandina J ₂)
5-HT	Serotonina
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína Ativadora-1 (fator de transcrição)
Bit. de colina	Bitartarato de colina
CD11b	Integrin α_M (Integrina α_M)
CD18	Integrin β_2 (Integrina β_2)
CEMIB-UNICAMP	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – Universidade Estadual de Campinas
Cg	Carragenina
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTRL	Contralateral
DH	Dieta Hiperlipídica
DP	Dieta Padrão
Egr-1	Early growth response protein 1 (Proteína de resposta de crescimento precoce 1)
FCA	Faculdade de Ciências Aplicadas
GW9662	2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide (2-cloro-5-nitro-N-fenilbenzamida)
h	horas
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1)
IFN-γ	Interferon gamma (Interferon gama)

IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa (Inibidor de fator nuclear kappa)
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina-13
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (Induzível sintase de óxido nítrico)
I-κB	I kappa B (Complexo enzimático quinase)
JNK	c-Jun N-terminal kinases (c-Jun N-terminal quinase)
Kcal	quilocaloria
MAP	Mitogen Activated Protein Kinases (Proteína-quinase ativadas por mitógenos)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1(Proteína quimioatraente de monócitos -1)
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Factor nuclear kappa B (Fator Nuclear kappa B)
p65 e p50	Fator de transcrição p50 e fator de transcrição p65
PPAR-α	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR-β/δ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma beta/delta
PPAR-γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
RNA	Ácido ribonucleico

STAT-3 Signal transducer and activator of transcription 3 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3)

TLR Toll Like Receptor (receptores do tipo Toll)

TNF- α Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
μ	micro
γ	gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1 Animais.....	23
2.2 Procedimentos Gerais.....	23
2.3 Dieta.....	23
2.4 Indução da Dor Inflamatória.....	24
2.5 Administração Intraplantar de Drogas.....	25
2.6 Administração Intraperitoneal de Drogas.....	25
2.7 Drogas e Doses	25
2.8 Análise dos Dados.....	25
2.9. Delineamento experimental.....	26
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Estimativas indicam que até 2025 cerca de 2,3 bilhões de pessoas apresentarão quadro de sobrepeso e mais de 700 milhões de pessoas serão clinicamente obesas em todo o mundo (WHO, 2015). Especificamente no Brasil, estudos epidemiológicos revelam que cerca de 38,8 milhões de pessoas ou seja, 40,6% da população brasileira com mais de 20 anos de idade apresenta sobrepeso e destas, 10,5 milhões são clinicamente obesas (POF, IBGE 2015). Sabe-se que a obesidade é frequentemente associada a altos índices de morbidade e mortalidade (CALLE et al., 1999; JANKE et al., 2015). Além disso, existem evidências que associam a obesidade ao desenvolvimento de diversos tipos de patologias, nas quais a dor é um dos principais sintomas (KOYANAGI et al., 2015).

Os mecanismos de associação entre obesidade e dor ainda não são bem estabelecidos. São sugeridos mecanismos biomecânicos (resultantes de desalinhamentos e sobrecargas articulares que podem gerar lesões musculoesqueléticas e dor) (FABRIS DE SOUZA et al., 2005; FELSON et al., 2004), sensoriais (alterações no processamento da informação dolorosa) (KHIMICH, 1997; RAMZAN et al., 1993) e inflamatórios (resultantes de mecanismos multifatoriais, p.ex. o papel do tecido adiposo na inflamação subclínica) (HOTAMISLIGIL, 2000). Sobre o papel do tecido adiposo na dor, sabe-se que ele é capaz de alterar respostas endócrinas e metabólicas e, conseqüentemente, influenciar respostas inflamatórias e dolorosas (LEE et al., 2005), a partir do seu envolvimento com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (KERSHAW; FLIER, 2004).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um estudo para avaliar se o processo de ganho de peso com o consumo de dieta hiperlipídica modularia a sensibilidade dolorosa a estímulos inflamatórios. Os resultados demonstraram que os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentam menor resposta dolorosa a estímulos inflamatórios quando comparados aos animais tratados com dieta padrão (Figura 1A). A partir de então, analisamos se o sistema opióide periférico estaria envolvido nessa resposta. Os resultados demonstraram que a administração da naloxona, um antagonista não seletivo do sistema opióide, não foi capaz de reverter a diminuição da resposta dolorosa após 3 (Figura 1B), 6 (Figura 1C) e 9 semanas (Figura 1D) de dieta hiperlipídica, sugerindo que o sistema opióide periférico não está envolvido nessa modulação dolorosa.

Figura 1

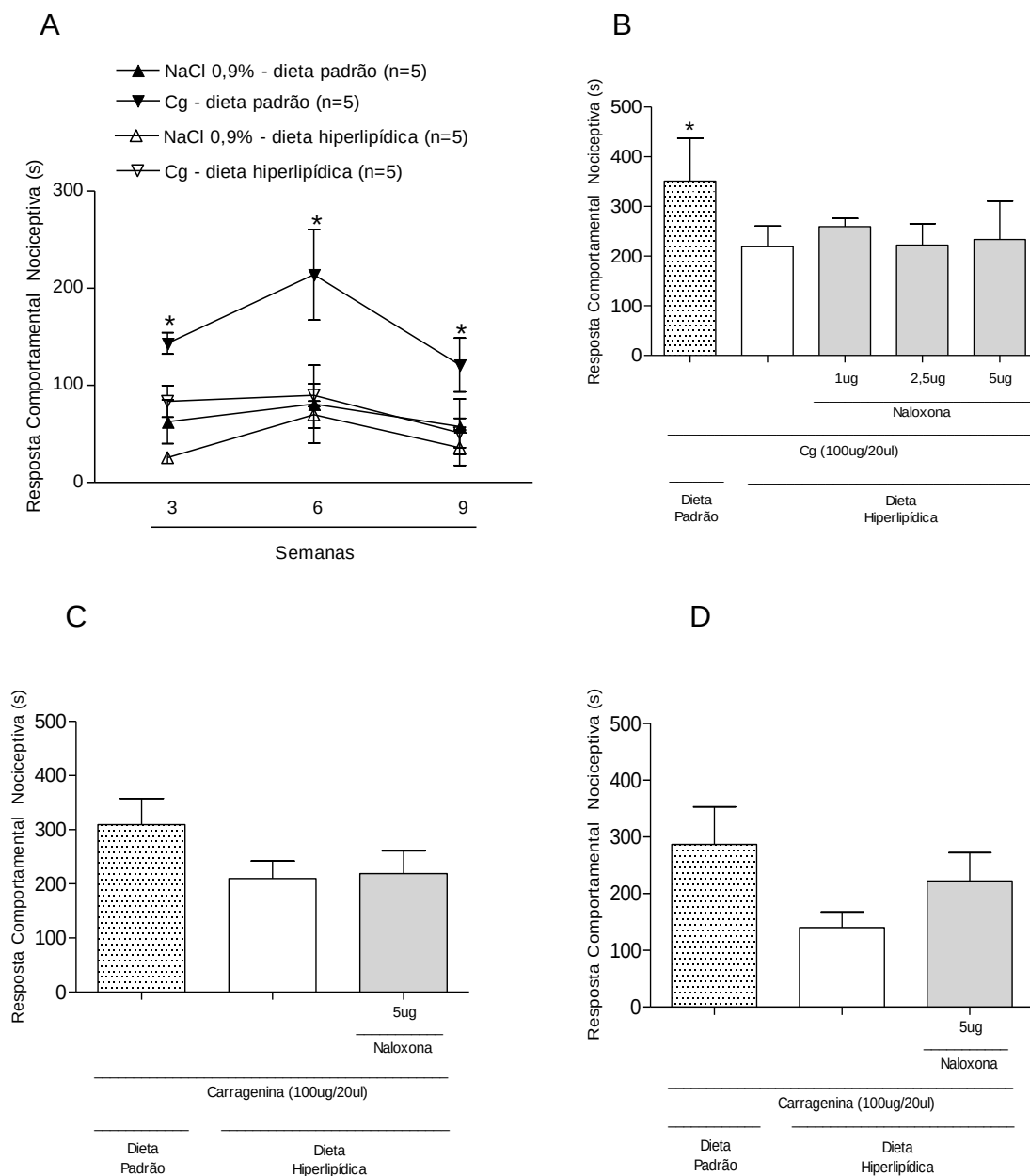


Fig. 1. Dieta hiperlipídica induz hipoalgesia não mediada pelos receptores opióides periféricos.

A administração de carragenina (Cg, estímulo inflamatório) em camundongos com dieta padrão induziu resposta comportamental dolorosa significativamente maior do que os outros tratamentos, como indicado pelo símbolo “*” (A, $p < 0,05$, Two Way ANOVA, Bonferroni). A administração de naloxona (1; 2,5 e 5 μ g; pré-tratamento de 30 minutos) não reverteu a diminuição da dor após 3 semanas de dieta hiperlipídica (B, $p > 0,05$, Teste Tukey). A Naloxona (5 μ g; pré-tratamento de 30 minutos) também não reverteu a diminuição da dor após 6 (C, $p > 0,05$, Teste Tukey) ou 9 semanas de dieta hiperlipídica (D, $p > 0,05$, Teste Tukey).

Os receptores PPAR fazem parte de uma família de receptores nucleares (PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ) que regulam uma série de processos relacionados à homeostase de lipídeos (SZATMARI et al., 2006; SMITH 2002) e da glicose (KIM; AHN, 2004). Os receptores PPAR são importantes moduladores de diversos processos inflamatórios e imunológicos (IBARRA-LARA et al., 2016; MASSARO et al., 2016), incluindo processos dolorosos (FEHRENBACHER et al., 2009, NAPIMOGA et al. 2008). Especificamente, os receptores PPAR- γ são expressos em diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos e monócitos (GREENE et al., 1995, BRAISSANT et al., 1996). Um dos seus ligantes endógenos é a prostaglandina 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), um derivado do metabolismo da Prostaglandina D₂, que é produzida por células do sistema imune (STRAUSS; GLASS, 2001; ZINGARELLI; COOK, 2005). O mecanismo de ação dos receptores PPAR, de maneira geral e simplificada, baseia-se na modulação da transcrição gênica (KREY et al., 1993; IJPENBERG et al., 1997). Como resultado específico da ativação de receptores PPAR- γ , há importante modulação dos processos inflamatórios e, conseqüentemente, da dor. Tem sido descrito que a terapia com agonistas de receptores PPAR- γ reduz marcadores inflamatórios de adesão celular (ICAM-1, CD11b/CD18 e P-selectina), de citocinas (TNF- α , IL-12, MCP-1 e MCP-3), iNOS, e a ativação de fatores de transcrição (Egr-1, Jun, AP-1 and NF- κ B) (para revisão: MORAES et al., 2006). É interessante ressaltar que a 15d-PGJ₂, por si só, também é capaz de regular negativamente a expressão de NF- κ B (RICOTE et al., 1998; STRAUS et al., 2000), via inibição da I- κ B quinase ou diretamente via interação com a NF- κ B (ROSSI et al., 2000). Essa regulação negativa resulta, em última instância, na inibição da ativação do gene da COX2 e na redução da liberação de prostaglandinas (ROSSI et al., 1997; SUBBARAMIAH et al., 2001), um potente mediador inflamatório capaz de sensibilizar os nociceptores aferentes primários.

Considerando-se a dor uma manifestação de alerta ao organismo sobre a presença de estímulos potencialmente lesivos, a diminuição da sensibilidade dolorosa a esses estímulos pode resultar em lesões. Portanto, a associação da obesidade com a diminuição da sensibilidade dolorosa a estímulos inflamatórios é potencialmente prejudicial ao organismo. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores PPAR- γ periféricos e centrais como moduladores da dor inflamatória em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Objetivo Geral: O objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores PPAR- γ periféricos e centrais como moduladores da dor inflamatória em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais:

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* (machos) da linhagem *Swiss*, provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério da FCA em gaiolas plásticas (cinco por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número 4256-1) e seguiram as diretrizes propostas pelo comitê para pesquisa e ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível e o número de camundongos utilizados foi mantido ao mínimo necessário (aproximadamente cinco por grupo).

2.2. Procedimentos Gerais:

As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 09:00 e 17:00h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de sete dias. Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT et al., 1986).

2.3. Dieta:

Dois dias após chegarem ao biotério da FCA, os animais foram selecionados conforme os grupos experimentais. O grupo controle recebeu dieta padrão e os grupos teste, dieta hiperlipídica. Para os grupos que receberam dieta hiperlipídica, inicialmente e até completarem 6 semanas, a suplementação foi com dieta de crescimento, e após esse período, com dieta de manutenção. A dieta

hiperlipídica foi preparada usando como referência a composição descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica de manutenção

Ingrediente	DIETA DE MANUTENÇÃO		
	Quantidade (g)	Kcal	% do total calórico
Amido	167,1	668,4	41,61
Malto	125	500	
Sacarose	201	804	
Caseína	167	668	14,09
Óleo de soja	40	360	45,57
Banha	200	1800	
Minerais	35	0	
Vitaminas	10	0	
Fibras	50	0	
L-cistina	2,4	0	
Bit. de colina	2,5	0	
TOTAL	1000	4800,4	101,27

2.4. Indução da Dor Inflamatória:

A dor inflamatória foi induzida através da administração de carragenina no tecido subcutâneo da pata dos camundongos. A carragenina induz sensibilização do nociceptor aferente primário sem manifestação de comportamentos dolorosos. Sendo assim, uma estimulação sublimiar mecânica ou química é necessária para evidenciar esse processo. No presente estudo, utilizamos um estímulo químico, através da administração subcutânea de serotonina (5-HT) (TEIXEIRA, 2010). Esse estímulo foi administrado 3 horas após a carragenina, uma vez que esse é o período de pico da resposta da carragenina.

As respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de levantar reflexamente e de coçar a pata submetida à administração subcutânea da carragenina foram quantificadas durante o período de 60 min, divididos em 10 blocos de 6 min. A intensidade da resposta comportamental foi quantificada somando-se o número de vezes que o animal levantou a pata reflexamente com o tempo que ele passou coçando a pata afetada (PARADA et al, 2001).

2.5. Administração intraplantar de drogas:

As diferentes drogas (carragenina, serotonina e GW9662) foram administradas via intraplantar na face dorsal da pata traseira dos animais através de uma seringa Hamilton de 50 μ L e agulha 30 gauge acoplada a uma cânula de polietileno. O volume final injetado foi de 20 μ L.

2.6. Administração intraperitoneal de drogas:

O GW9662 (2mg/Kg) foi administrado no quadrante inferior direito da região peritoneal do camundongo através de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha hipodérmica 26 Gauge (BD). O volume final injetado foi de 250 μ L.

2.7. Drogas e Doses:

Carragenina (100 μ g/20 μ L) e serotonina (75 μ g/20 μ L) (Conforme estabelecido no projeto anterior) foram administrados no tecido subcutâneo da pata dos animais. O antagonista seletivo de receptor PPAR- γ , GW9662 (2-chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide), foi administrado no tecido subcutâneo nas doses 1.5, 3 e 9ng/20 μ L e por via intraperitoneal na dose de 2mg/Kg (GRIGGS et al., 2015). Todas as drogas foram obtidas da Sigma Aldrich e diluídas em salina.

2.8. Análise dos Dados:

Os dados com homogeneidade de variância foram analisados através da aplicação do teste estatístico One-Way análise de variância (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de Tukey. Quando apropriado o teste T foi aplicado. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Os dados foram apresentados pela média $\pm$ o Erro Padrão. O programa Prisma foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

2.9. Resumo do Delineamento experimental:

2.9.1. Avaliação do envolvimento dos receptores PPAR- γ na modulação da hipotalgesia em camundongos tratados com dieta hiperlipídica:

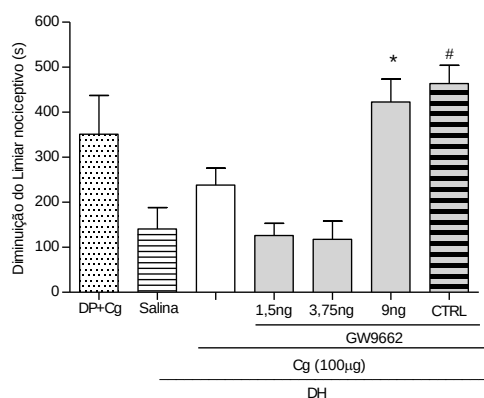
Considerando-se os dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que demonstraram que, em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, a redução da resposta dolorosa a estímulos inflamatórios é independente da ativação de receptores opióides periféricos, avaliamos nesse projeto o envolvimento dos receptores PPAR- γ nesta resposta. Para isso, os animais foram pré-tratados com GW9662 (1,5 ng/20ul) no tecido subcutâneo da pata traseira do animal ou por via intraperitoneal, 30 ou 15 minutos antes do estímulo inflamatório (carragenina/serotonina), respectivamente, e a resposta dolorosa foi avaliada três horas após a carragenina. Como a redução da resposta dolorosa ao estímulo inflamatório ocorreu na 3^a, 6^a e 9^a semana de dieta hiperlipídica, o envolvimento dos receptores PPAR- γ foi avaliado nesses mesmos períodos. É importante esclarecer que um grupo foi destinado à avaliação apenas na 3^a semana, um segundo grupo foi destinado à avaliação na 6^a semana e um terceiro grupo foi destinado à avaliação na 9^a semana. Como controle do GW9662 foi utilizada salina e como controle da dieta hiperlipídica foi utilizada dieta padrão.

3. RESULTADOS

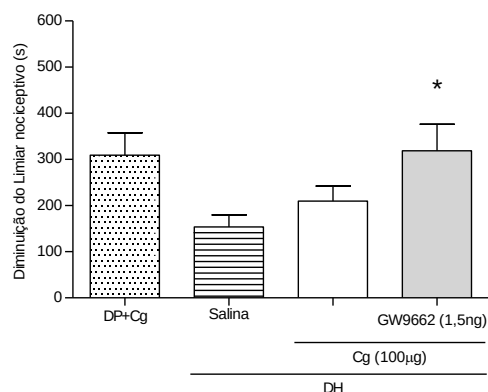
Com objetivo de avaliar o papel dos receptores PPAR- γ periféricos no desenvolvimento da hipoalgesia em animais que consumiram dieta hiperlipídica, testamos se o pré-tratamento intraplantar com GW9662 seria capaz de reverter a hipoalgesia induzida em animais pré-tratados com dieta hiperlipídica. Verificamos que o pré-tratamento com GW9662 (9ng, mas não 1,5 e 3ng, intraplantar) foi capaz de reverter a hipoalgesia em animais tratados com dieta hiperlipídica por 3 semanas (Fig 2A) e que a dose menor de 1,5 ng foi capaz de exercer o mesmo efeito em animais tratados há 6 (Fig 2B) e 9 semanas (Fig. 2C) ($p < 0,05$; Anova, Teste Tukey). Esses resultados demonstram que os receptores PPAR- γ participam da hipoalgesia induzida em animais que consumiram dieta hiperlipídica. A administração de GW9662 na pata contralateral, testado apenas na terceira semana, também reverteu essa resposta hipoalésgica (Fig. 2A $p < 0,05$; Test T), sugerindo um efeito central do GW9662.

Figura 2.

A) Terceira semana



B) Sexta semana



C) Nona semana

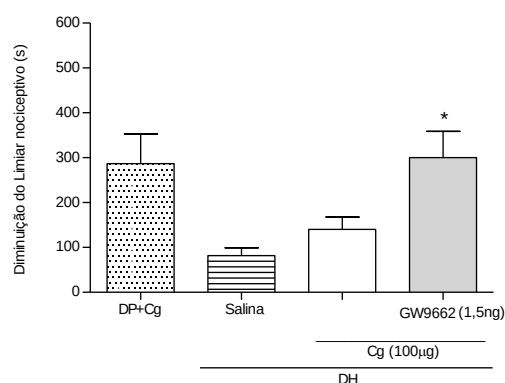


Fig.2: Envolvimento dos receptores PPAR- γ periféricos na hipoalgesia observada em animais que consumiram dieta hiperlipídica. A administração intraplantar de GW9662 reverteu o comportamento hipoalgésico em animais que consumiram a dieta hiperlipídica nas 3 semanas avaliadas, conforme indicado pelo símbolo “*” ($p < 0.05$; teste Tukey). A administração de GW9662 na pata contralateral à carragenina também reverteu a hipoalgesia, conforme indicado pelo símbolo “#” ($p < 0.05$; Teste T). Legenda: DP = Dieta Padrão; DH = Dieta Hiperlipídica; Cg = Carragenina; CTRL = contralateral.

A seguir, avaliamos o envolvimento dos receptores PPAR- γ sistêmicos na hipoalgesia em animais que consumiram dieta hiperlipídica. Para isso, realizamos o mesmo pré-tratamento com GW9662, entretanto, nesse momento, a via de administração foi intraperitoneal. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com GW9662 (2mg/Kg, i.p.) foi capaz de reverter a hipoalgesia em animais tratados com dieta hiperlipídica por 9 semanas de dieta (Fig 3C) ($p < 0,05$; Anova, teste Tukey), mas não por 3 (Fig 3A) e 6 semanas (Fig. 3B) ($p > 0,05$; Anova). Esses resultados confirmam os resultados anteriores de que os receptores PPAR- γ estão envolvidos na hipoalgesia observada em animais que consumiram dieta hiperlipídica e apontam que os receptores periféricos talvez sejam mais eficientes nesse processo.

Figura 3.

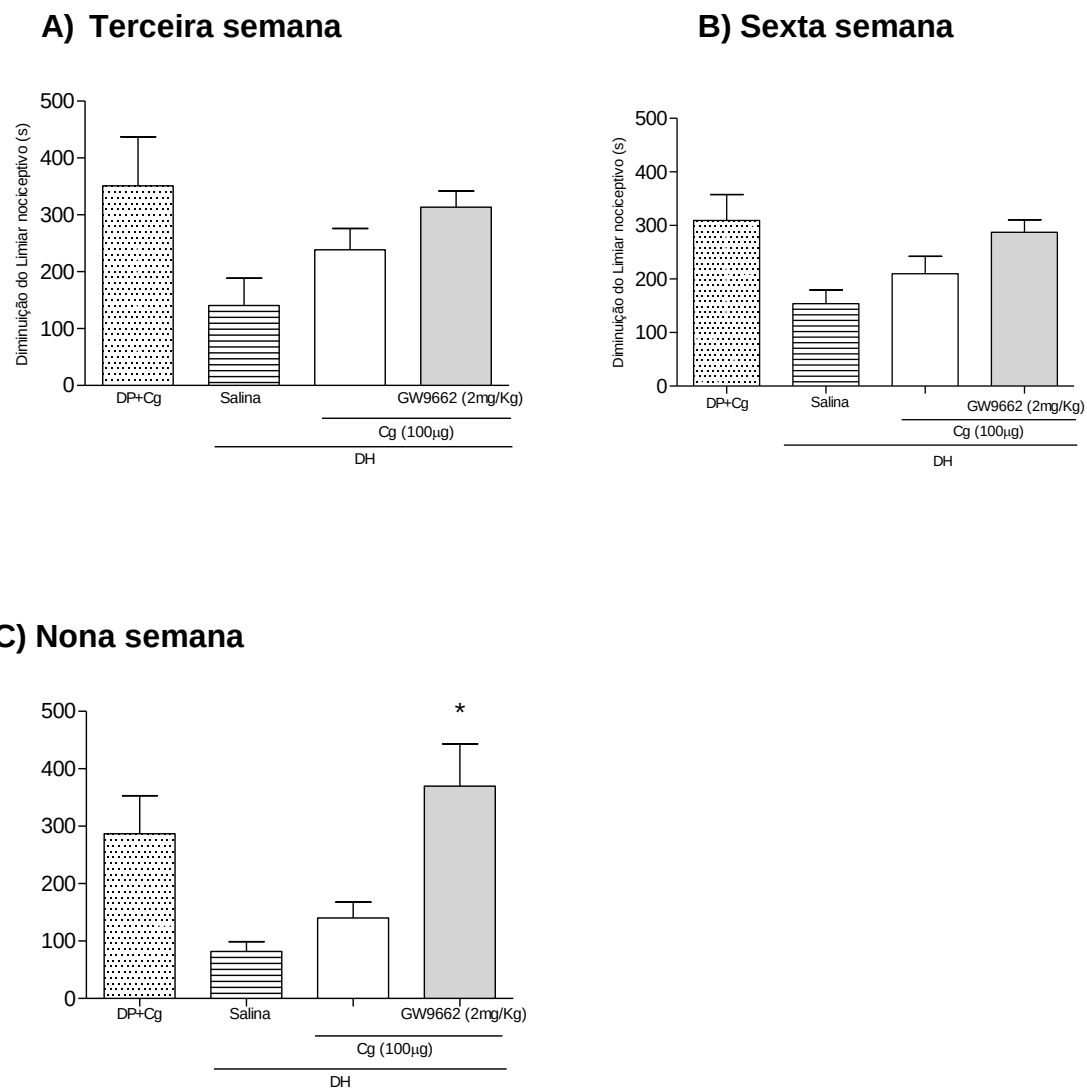


Fig.3: Envolvimento dos receptores PPAR- γ sistêmicos na hipoalgesia observada em animais que consumiram dieta hiperlipídica. A administração intraperitoneal de GW9662 reverteu o comportamento hipoalgésico observado em animais que consumiram dieta hiperlipídica apenas na 9ª semana de avaliação, conforme indicado pelo símbolo “*” ($p < 0.05$; Anova, teste de Tukey). Legenda: DP = Dieta Padrão; DH = Dieta Hiperlipídica, Cg = Carragenina.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Sabe-se que o consumo de dieta hiperlipídica é um importante fator para o desenvolvimento da obesidade nas sociedades modernas (STEIN; COLDITZ, 2004; MORENO; RODRIGUEZ, 2007) e que indivíduos obesos apresentam inflamação subclínica, que é caracterizada pela elevação dos níveis de proteína C reativa (BOCHUD et al., 2009), migração de neutrófilos (NIJHUS et al., 2009) e elevação dos níveis de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-12 e IL-13 (SCHIMITDT et al., 2015). A resposta inflamatória associa-se a fatores múltiplos, dentre eles destacam-se a inflamação hipotalâmica, resistência à insulina e à leptina (CAVALHEIRA et al., 2003; HOWARD et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005), os quais correlacionam-se, inclusive, com descompensação do equilíbrio entre gasto e ganho energético. Os receptores Toll Like (TLR), em especial o Toll like 4 (KIM et al., 2012), têm sua ativação relacionada à oferta de ácidos graxos na dieta, dentre eles os saturados, presentes em excesso nas dietas caracterizadas como hiperlipídicas (SHI et al., 2006). Eles dão início a uma série de reações intracelulares relacionadas a via das JNK (HIROSUMI et al., 2002) e IKK (KANG et al., 2017), as quais ativam a via do NF-KB (ARKAN et al., 2005) e inibem as vias da p65 e p50 culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias (TANG et al., 2010).

Muitos estudos vêm correlacionando a obesidade ao desenvolvimento de dor crônica (XU et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2017; GHEZELBASH et al., 2017). Um mecanismo interessante, e que vem sendo descrito como importante no desenvolvimento da obesidade é a ativação de receptores PPAR- γ (KADOWAKI et al., 2002). Sabe-se que os PPAR- γ fazem parte de uma família de receptores nucleares, constituídos pelos receptores PPAR- α , PPAR- δ e PPAR- γ que agem como importantes fatores de transcrição (KOTA et al., 2005) e que podem ser ativados por uma ampla variedade de ligantes, dentre eles os ácidos graxos e seus derivados (DELERIVE et al., 2000; DERVEHAND et al., 1996; FORMAN et al., 1997; KLIEWER et al., 1995; NAGY et al., 1998). Eles estão envolvidos com o metabolismo lipídico e dos carboidratos (CHO et al., 2008), além de estarem envolvidos com a diferenciação de macrófagos (ISSEMAN; GREEN, 1999). Especificamente, os receptores PPAR- γ são subdivididos em 2 subunidades: os receptores PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2, sendo os receptores PPAR- γ 2 expressos principalmente nos adipócitos (TONTONEZ et al., 1994) e estão envolvidos com a adipogênese (LI et al., 2016). Além disso, existem

evidências de que o consumo de dieta hiperlipídica é capaz de elevar as taxas de RNA mensageiro de receptores PPAR- γ 2 no tecido adiposo de camundongos (VIDAL-PUIG et al., 1996) e que o consumo de dieta hiperlipídica induz hipertrofia dos adipócitos e resistência à insulina (KUBOTA et al., 1999). Também foi descrito que camundongos knockout para PPAR- γ 2 apresentam uma diminuição do acúmulo de ácidos graxos no tecido adiposo em comparação com camundongos obesos normais (MEDINA-GOMEZ et al., 2007).

Considerando-se essas evidências de que os receptores PPAR- γ são importantes moduladores de células inflamatórias e do tecido adiposo, analisamos o envolvimento desses receptores, expressos em tecidos periféricos e centrais, na modulação da dor inflamatória, previamente verificada por nosso grupo de pesquisa, em animais submetidos à dieta hiperlipídica. Os resultados demonstraram que receptores PPAR- γ estão envolvidos na modulação da hipoalgesia em animais que consumiram dieta hiperlipídica e apontam que os receptores periféricos talvez sejam mais eficientes nesse processo. É importante esclarecer que, embora o GW9662, quando administrado na pata contralateral à carragenina, tenha revertido a resposta hipoalgésica, não podemos excluir o envolvimento dos receptores PPAR- γ expressos no tecido subcutâneo da pata dos animais. Os resultados também apontam que, com apenas 3 semanas de dieta hiperlipídica, já existem alterações nas vias de sinalização da dor inflamatória de forma a diminuir a percepção da dor, e que com 9 semanas, o envolvimento de receptores centrais parece ser mais proeminente. Esses dados são suportados por estudos que demonstram que os receptores PPAR, de forma geral, são importantes moduladores da hiperalgesia (MORGENWECK et al., 2010). Existem evidências de que a ativação dos receptores PPAR- γ modulam negativamente diferentes condições dolorosas, como a dor neuropática (GRIGGS et al., 2015; RAGHAVENDER et al., 2016), a dor induzida pelo consumo crônico de opióides (CHARKHPOUR et al., 2015), a nocicepção induzida pela formalina (MANSOURI et al., 2017) e a hiperalgesia induzida pela carragenina (HOUSHMAND et al., 2016; QUINTANILLA et al., 2014). Esses efeitos devem-se à expressão dos receptores PPAR- γ não só no tecido adiposo mas também em fibroblastos, monócitos, macrófagos e neutrófilos (BRAISSANT et al., 1996; GREENE et al., 1995), importantes células no processo de inflamação. Foi demonstrado que os receptores PPAR- γ exercem um papel na diferenciação e ativação de monócitos no processo inflamatório (RICOTE et al., 1999; TONTONNOZ et al., 1998), inibem a ativação de macrófagos e neutrófilos (RICOTE et al., 1998; GREENE et al., 1995), diminuem a

produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (JIANG et al 1998), e modulam a inflamação crônica em ratos (SANCHEZ-HIDALGO et al., 2005) através da inibição da via do MCP-1 e das MAP quinases (FREITAG et al., 2014). Finalmente é importante também destacar a função gênica dos receptores PPAR- γ na modulação do processo inflamatório, via interferência na via do NF- κ B, fator de transcrição AP-1 (WANG et al., 2001), e STAT-3 (WANG et al., 2003; LI et al., 2000).

Em suma, considerando-se as respostas do organismo ao consumo de dieta hiperlipídica e que os receptores PPAR- γ estão periféricamente distribuídos tanto no tecido adiposo quanto em células inflamatórias, nossos resultados sugerem que os receptores PPAR- γ participam da hipoalgesia induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica, via células inflamatórias. Além disso, há participação dos receptores PPAR- γ expressos no sistema nervoso central, especificamente em áreas relacionadas à sinalização da dor inflamatória.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Frances V; FRANKLIN, Keith BJ; CONNELL, Barry. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **European Journal Pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 141-144, 1986.

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature Medicine**, v. 99, n. 5, p. 557–566, 2013.

ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191–198, 2005.

BOCHUD, M.; MARQUANT, F.; MARQUES-VIDAL, P. M.; et al. Association between C-reactive protein and adiposity in women. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.94, p.3969-77, 2009.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. **Endocrinology**, v.137, p.354-366, 1996.

CALLE, E.E.; THUN, M. J.; PETRELLI, J. M.; et al. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p. 1097–1105, 1999.

CAMP, H.S.; TAFURI, S.R.; LEFF, T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. **Endocrinology**, v.140, p. 392-7, 1999.

CARVALHEIRA, J.B.C; RIBEIRO E.B; ARAUJO E.P; et al. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**, v.46, p.1629–1640, 2003.

CHANG, W.-C.; JAN WU, Y.-J.; CHUNG, W.-H.; et al. Genetic variants of PPAR-gamma coactivator 1B augment NLRP3-mediated inflammation in gouty arthritis. **Rheumatology**, v.56, n.3, p.457-466, 2017.

CHEN, F.; WANG, M.; O'CONNOR, J. P.; et al. Phosphorylation of PPAR γ via Active ERK1/2 Leads to its Physical Association with p65 and Inhibition of NF- κ B. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 4, p. 732–744, 2003.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflammation Research**, v.49, p.497–505, 2000.

CHO, M. C.; LEE, K.; PAIK, S. G.; et al. Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) modulators and metabolic disorders. **PPAR Research**, v. 2008, p.1-14, 2008.

DAYNES, R.A.; JONES, D.C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 748–59, 2002.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.

DELERIVE, P.; FURMAN, C.; TEISSIER, E.; et al. Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner. **FEBS Letters**, v. 471, p. 34–38, 2000.

DEVCHAND, P.R.; KELLER, H.; PETERS, J.M.; et al. The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v.384, p.39–43, 1996.

DONVITO, G.; BAGDAS, D.; TOMA, W.; et al. The interaction between $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- α represents a new antinociceptive signaling pathway in mice. **Experimental Neurology**, v. 295, p. 194–201, 2017.

FEHRENBACHER, J.C.; LOVERME, J.; CLARKE, W.; et al. Rapid pain modulation with nuclear receptor ligands. **Brain Res Rev.** v. 60, p.114–124, 2009.

FORMAN, B.M.; CHEN, J.; EVANS, R.M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.4312–4317, 1997.

FREDERIKSEN, L.; BRØDBAEK, K.; FENGER, M.; et al. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 87, p. 3989-92, 2002.

FREITAG, C.M.; MILLER, R.J. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate neuropathic pain: a link to chemokines? **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.8, p.1-17, 2014.

GHEZELBASH, F.; SHIRAZI-ADL, A.; PLAMONDON, A.; et al. Obesity and Obesity Shape Markedly Influence Spine Biomechanics: A Subject-Specific Risk assessment Model. **Annals of Biomedical Engineering**, v.45, p.2373-2382, 2017.

GHOLAMREZA, H.; MANSOURI, M.T.; NAGHIZADEH, B.; et al. Potentiation of indomethacin-induced anti-inflammatory response by pioglitazone in carrageenan-induced acute inflammation in rats: Role of PPAR γ receptors. **International Immunopharmacology**, v.38, p. 434–442, 2016.

GREENE, M.E.; BLUMBERG, B.; MCBRIDE, O.W.; et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. **Gene Expression**, v.4, p.281–299, 1995.

GRIGGS, R.B.; DONAHUE, R.R.; ADKINS, B.G.; et al. Pioglitazone inhibits the development of hyperalgesia and sensitization of spinal nociceptive neurons in type 2 diabetes. **The journal of Pain**, v.17, p. 359-373, 2016.

GRIGGS, R.B.; DONAHUE, R.R.; MORGENWECK, J.; et al. Pioglitazone rapidly reduces neuropathic pain through astrocyte and non-genomic PPAR γ mechanisms. **Pain**, v.156, p.469-482, 2015.

HASHIMOTO, Y.; MATSUDAIRA, K.; SAWADA, S.S.; et al. Obesity and low back pain: a retrospective cohort study of Japanese males. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 29, p. 978-983, 2017.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333–336, 2002.

HOLLAND, W. L.; BROZINICK, J. T.; WANG, L. P.; et al. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 3, p. 167–179, 2007.

HOUSHMAND, G.; MANSOURI, M.T.; NAGHIZADEH, B.; et al. Potentiation of indomethacin-induced anti-inflammatory response by pioglitazone in carrageenan-induced acute inflammation in rats: Role of PPAR- γ receptors. **International Immunopharmacology**, v.38, p.434-42, 2016.

HOWARD, J.K.; CAVE, B.J.; OKSANEN, L.J.; et al. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. **Nature Medicine**, v. 10, p.734–738, 2004.

IBARRA-LARA, L.; DEL VALLE-MONDRAGÓN, L.; SORIA-CASTRO, E.; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulation by clofibrate favors an antioxidant and vasodilator environment in a stressed left ventricle. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p.692–702, 2016.

IBARRA-LARA, M.L.; SÁNCHEZ-AGUILAR, M.; SORIA, E.; et al. **Can J Physiol Pharmacol**. V.17, p.1-9, 2016.

IJPENBERG, A.; JEANNIN, E.; WAHLI, W.; et al. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p. 20108–20117, 1997.

JANKE, E.A.; RAMIREZ, M.L.; HALTZMAN, B.; et al. Patient's experience with comorbidity management in primary care: a qualitative study of comorbid pain and obesity. **Primary Health Care Research & Development**, v.17, p. 33–41, 2016.

JAUDSZUS, A.; LORKOWSKI, S.; GRUEN, M.; et al. Limited Applicability of GW9662 to Elucidate PPAR γ -Mediated Fatty Acid Effects in Primary Human T-Helper Cells. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, p.1-6, 2014.

JIANG, C.; TING, A.T; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, p. 82–86, 1998.

KADOWAKI, T.; HARA, K.; KUBOTA, N.; et al. The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. **Journal of diabetes and its complications**, v. 16, n. 1, p. 41–5, 2002.

KANG, H. H.; KIM, I. K.; LEE, H.; et al. Chronic intermittent hypoxia induces liver fibrosis in mice with diet-induced obesity via TLR4/MyD88/MAPK/NF-kB signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 2, p. 349–355, 2017.

KANG, Y. E.; KIM, J. M.; JOUNG, K. H.; et al. 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. 1–14, 2016.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v.11, p. 373-384, 2010.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p.2548-2556, 2004.

KIM, S. J.; CHOI, Y.; CHOI, Y. H.; et al. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 113–122, 2012.

KLIEWER, S.A.; LENHARD, J.M.; WILLSON, T.M.; et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v.83, p.813–819, 1995.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H. W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85–94, 2005.

KOYANAGI, A.; STICKLEY, A.; GARIN, N.; et al. The association between obesity and back pain in nine countries: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 123, 2015.

KREY, G.; KELLER, H.; MAHFOUDI, A.; et al. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. **The Journal of Steroid biochemistry and molecular biology**, v.47, p. 65-73, 1993.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; MIKI, H.; et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. **Molecular Cell**, v. 4, n. 4, p. 597–609, 1999.

LEE, S.; KUK, J. L.; KATZMARZYK, P. T.; et al. Metabolic Risk Independent of Abdominal Subcutaneous and Visceral. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 895–901, 2005.

LI, M.; PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma- dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, p. 4699-4707, 2000.

LU, M.; SARRUF, D. A.; TALUKDAR, S.; et al. Brain PPAR- γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. **Nature Medicine**, v. 17, n. 5, p. 618–622, 2011.

MAEDA, T.; KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, Y.; et al. Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.13076-13081, 2009.

MANSOURI, M.T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; et al. Pharmacological evidence for systemic and peripheral antinociceptive activities of pioglitazone in the rat formalin test: Role of PPAR γ and nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v.805, p. 84–92, 2017.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B.; et al. Pharmacological evidence for systemic and peripheral antinociceptive activities of pioglitazone in the rat formalin test: Role of PPAR γ and nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v. 805, n. July 2016, p. 84–92, 2017.

MASSARO, M.; SCODITTI, E.; PELLEGRINO, M.; et al. Therapeutic potential of the dual peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) alpha/gamma agonist aleglitazar in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes. **Pharmacological Research**, v.107, p.125–136, 2016.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J.P.; et al. Peroxisome Proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p.726–741, 2006.

MOHAMMAD, C.; HAMED, G.; SAEED, G.; et al. Protective effect of pioglitazone on morphine-induced neuroinflammation in the rat lumbar spinal cord. **Journal of Biomedical Science**, p.1-6, 2015.

MORAES, L.A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology Therapeutics**, v.110, p.371–385, 2006.

MORENO, L.A.; RODRIGUEZ, G. Dietary risk factors for development of childhood obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p.336–341, 2007.

MORGENWECK, J.; ABDEL-ALEEM, O. S.; MCNAMARA, K. C.; et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ in brain inhibits inflammatory pain, dorsal horn expression of Fos, and local edema. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 337–345, 2010.

NAPIMOGA, M.H.; SOUZA, G.R.; CUNHA, T.M.; FERRARI, L.F.; et al. 15d-Prostaglandin J₂ Inhibits Inflammatory Hypernociception: Involvement of Peripheral Opioid Receptor. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 324, p.313-321, 2008.

NIJHUIS, J.; RENSEN, S.S.; SLAATS, Y.; et al. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. **Obesity**, v. 17, p.2014–2018, 2009.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, p. 937–944, 2001.

POF, IBGE (2015). Obesidade atinge mais de 40% da população. Disponível em: <http://teen.ibge.gov.br/noticias-teen/2836-obesidade-atinge-mais-de-40-da-populacao-brasileira>. Acesso em abril/2016.

QUINTANILLA, R.A.; UTRERAS, E.; CABEZAS-OPAZO, F.A. Role of PPAR γ in the Differentiation and Function of Neurons. **PPAR Research**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

RAGHAVENDER, P.; ANIL, K.; ARCHANA, B.; et al. Ameliorative potential of pioglitazone and ceftriaxone alone and in combination in rat model of neuropathic pain:

Targeting PPAR- γ and GLT-1 pathways. **Pharmacological Reports**, v.68, p.85–94, 2016.

RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v.391, p.79–82, 1998.

RICOTE, M.; HUANG, J.; WELCH, J.; et al. The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. **Journal of Leukocyte Biology**, v.66, p.733-739, 1999.

RIEDLINGER, T.; DOMMERHOLT, M. B.; WIJSHAKE, T.; et al. NF- κ B p65 serine 467 phosphorylation sensitizes mice to weight gain and TNF α -or diet-induced inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 10, p. 1785–1798, 2017.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v.45, p.211- 216, 1991.

ROSSI, A.; ELIA, G.; SANTORO, M.G. Inhibition of nuclear factor κ B by prostaglandin A₁: An effect associated with heat shock transcription factor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.746-750, 1997.

ROSSI, A.; KAPAHI, P.; NATOLI, G.; et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. **Nature**, v. 403, p.103–108, 2000.

RYAN, B.G.; RENEE, R.D.; JENNY, M.; et al. Pioglitazone rapidly reduces neuropathic pain through astrocyte and non-genomic PPAR γ mechanisms. **Pain**, v.156 (3), p.469–482, 2015.

SAITO, T.; HASEGAWA-MORIYAMA, M.; KURIMOTO, T.; et al. Resolution of Inflammation by Resolvin D1 Is Essential for Peroxisome Proliferator–activated Receptor mediated Analgesia during Postincisional Pain Development in Type 2 Diabetes. **Anesthesiology**, v.123, p.1420-34, 2015.

SANCHEZ-HIDALGO, M.; MARTIN, A.R; VILLEGAS, I. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p. 1733–1744, 2005.

SCHMIDT, F.M.; WESCHENFELDER, J.; SANDER, C.; et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. **Plos one**, v. 10, 2015.

SEUNG-WON, P.; JAE-HYUK, Y.; GURUWATTAN, M.; et al. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics March**, v. 320, n.3, p.1002-1012, 2007.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUE, K.; et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.11, p.3015-3025, 2006.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUE, K.; et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.11, p.3015–3025, 2006.

STEIN, C.J.; COLDITZ, G.A. The Epidemic of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 2522-2525, 2004.

STRAUS, D.S.; PASCUAL, G.; LI, M.; et al. 15-Deoxy- $\delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 97, n.9, p.4844–4849, 2000.

STUMVOLL, M.; HÄRING, H. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 pro12 ala polymorphism. **American Diabetes Association**, v. 51, n.8, p.2341-7, 2002.

SUBBARAMAIAH, K.; LIN, D.T.; HART, J.C; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.12440–12448, 2001.

TANG, T.; ZHANG, J.; YIN, J.; et al. Uncoupling of inflammation and insulin resistance by NF-kappaB in transgenic mice through elevated energy expenditure. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.7, p.4637-44, 2010.

TAYLOR, B.K. N-acylethanolamine acid amidase (NAAA): A new path to unleash PPAR-mediated analgesia. **Pain**, v.154, n.3, p.326-327, 2013.

TAYLOR, B.K. Resolvin D1: A New Path to Unleash the Analgesic Potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ for Postoperative Pain in Patients with Diabetes. **Anesthesiology**, v. 123, p.1231–1232, 2015.

TEIXEIRA, J.M.; OLIVEIRA-FUSARO, M.C.; PARADA, C.A; et al. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X7 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v.644, n.1-3, p.55–60, 2010.

TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J.G; et al. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v.93, n. 2, p.241–52, 1998.

TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R.A.; et al. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & Development**, v.8, p.1224–1234, 1994.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LIÑAN, M.; LOWELL, B. B.; et al. Regulation of PPAR γ gene expression by nutrition and obesity in rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 11, p. 2553–2561, 1996.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHAO, L.; et al. Down-regulation of PPAR-alpha in the spinal cord contributes to augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in diet-induced obese rats. **Neuroscience**, v. 278, p.165–178, 2014.

WANG, L.H.; YANG, Y.X.; ZHANG, X.; et al. Transcriptional inactivation of STAT3 by PPAR-gamma suppresses IL6-responsive multiple myeloma cells. **Immunity**, v.20, n.2, p.205–218, 2004.

WANG, P.; ANDERSON, P.O.; CHEN, S.; et al. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF- κ B in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. **International Immunopharmacology**, v.1, n.4, p. 803–812, 2001.

WHO. Obesity and overweight. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

WILLSON, T. M.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D. D.; et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.4, p. 527–550, 2000.

XU, L.; TANG, D.; GUAN, M.; et al. Effect of high-fat diet on peripheral neuropathy in C57BL/6 mice. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p.1-8, 2014.

YANAN, Z.; CHENGWEI, S.; HAIYOU, L.; et al. Ursolic acid prevents augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in high-fat diet-induced obese rats by restoring downregulated spinal PPAR α . **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 5309-5316, 2016.

YONG, F.; JUNTING, M.; XIAFEI, S.; et al. A novel pyrazole-containing indolizine derivative suppresses NF- κ B activation and protects against TNBS-induced colitis via a PPAR-gamma dependent pathway. **Biochemical Pharmacology**, v.135, n.1, p.126–138, 2017.

ZHANG, F.; LAVAN, B.E.; GREGOIRE, F.M. Selective Modulators of PPAR- γ Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. **PPAR Research**, v. 2007, p.1-7, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109–110, 1983.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIÓIDES E PPAR- γ PERIFÉRICOS E CENTRAIS NA MODULAÇÃO DA DOR INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA, registrada com o nº 4256-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cláudia G. Oliveira Fusaro e Natália Pereira as Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 16 de agosto de 2016.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2016-01/12/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/08/2016-01/12/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongos Heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	160
Peso / Idade:	03 semanas / 10g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 16 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

