



JOSEANE MORARI

**“A FRACTALKINA (CX3CL1) ESTÁ ENVOLVIDA NAS ETAPAS INICIAIS
DE ATIVAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO HIPOTÁLAMO DE ROEDORES
OBESOS”**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSEANE MORARI

**“A FRACTALKINA (CX3CL1) ESTÁ ENVOLVIDA NAS ETAPAS INICIAIS DE ATIVAÇÃO
DA INFLAMAÇÃO NO HIPOTÁLAMO DE ROEDORES OBESOS”**

Orientador: Lício Augusto Velloso

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia Médica. Área de concentração: Biologia
Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA JOSEANE MORARI E ORIENTADA
PELO PROF.DR. LÍCIO AUGUSTO VELLOSO**

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M796f Morari, Joseane, 1982-
A fractalkina (CX3CL1) está envolvida nas etapas iniciais de ativação da inflamação no hipotálamo de roedores obesos / Joseane Morari. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Licio Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Quimiocina CX3CL1. 3. Hipotálamo - Infamação. I. Velloso, Licio Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fractalkine (CX3CL1) participates in the early stages of inflammation in hypothalamus of obese rodents

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Chemokine CX3CL1

Hypothalamus, Inflammation

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutora em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Licio Augusto Velloso [Orientador]

Fernanda Ortis

Fernanda Guarino De Felice

Sara Teresinha Olalla Saad

Marco Aurelio Ramirez Vinolo

Data de defesa: 27-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JOSEANE MORARI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO

2. PROF(A). DR(A). FERNANDA ORTIS

3. PROF(A). DR(A). FERNANDA GUARINO DE FELICE

4. PROF(A).DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

5. PROF(A).DR(A). MARCO AURELIO RAMIREZ VINOLO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de agosto de 2013

Àquele que despertou em mim o meu melhor,
e a cada dia me faz superar meus limites...

Obrigada Gu!

Dedico

Agradecimentos

À Deus pelas oportunidades de crescimento que colocou em minha vida. Hoje vejo que tudo que eu pedi se realizou, não da forma como eu acreditava que deveria ser, mas da melhor forma para mim.

À FAPESP que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por ter cedido sua estrutura para realização deste projeto de doutorado.

Aos meus pais, que me garantiram a possibilidade de estudar e me desenvolver profissionalmente.

Às minhas novas “mãe” e “avó” Denise e Nirce, pelas conversas, pelos jantares divertidos e por todo amor e carinho nesses dois anos de convivência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lício Augusto Velloso, pela excelente convivência, pelos seus ensinamentos acadêmicos e pelas ótimas discussões. Lembro-me de uma conversa que tivemos quando eu era aluna de iniciação científica, ainda no laboratório do Prof. Dr. Mário Saad. Durante esta conversa você traçou os passos da minha carreira, dizendo que eu terminaria o mestrado com 26 anos e o doutorado aos 30, e que neste momento eu estaria preparada para escolher entre realizar um pós doc ou já desenvolver minha função de bióloga. E você tinha toda razão... Ao longo dos anos fui percebendo que eu gostava muito de realizar os experimentos, desenvolver novas técnicas, auxiliar outras pessoas na parte metodológica...e isso me realizava plenamente. No fim da história, eu optei por ser bióloga, mas não contava que eu conseguiria desenvolver meus trabalhos em seu laboratório. Saiba que estou muito feliz por você ter reconhecido meu trabalho ao longo desses anos e acreditar que sou competente o suficiente para continuar em seu laboratório. Admiro sua inteligência,

perseverança, honestidade, disciplina e ética. Tenho certeza que isso te faz ser o excelente pesquisador que é.

Ao Prof. Dr. Gabriel Anhê, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Acredito que todos professores e pesquisadores deveriam ter a sua humildade, dedicação e ética.

Aos colaboradores deste projeto. É difícil falar de um em específico, pois todos foram necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela grande ajuda e dedicação.

Aos amigos do laboratório, pela boa convivência.

À Erika Anne, ao Gerson e ao Márcio Cruz, meus novos companheiros de trabalho, pela paciência, compreensão e ajuda na finalização deste projeto.

“Todo o meu saber consiste em saber que nada sei”

Sócrates

Nas últimas décadas tornou-se claro que indivíduos e animais obesos apresentam um quadro subclínico de inflamação sistêmica. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório ao longo dos últimos 10 anos revelaram que a inflamação do hipotálamo está presente em roedores obesos e sua inibição por métodos genéticos e farmacológicos resulta na correção do fenótipo obeso e dos distúrbios metabólicos comumente associados à obesidade. Ácidos graxos saturados de cadeia longa presentes na dieta parecem ser os principais responsáveis pela ativação da resposta inflamatória no hipotálamo. Os primeiros sinais de inflamação podem ser detectados 24 h após a introdução de uma dieta rica neste tipo de gordura. Pelo menos dois mecanismos moleculares foram identificados como potenciais desencadeadores desta resposta inflamatória, sendo eles; a ativação de receptores TLR4, e a indução do estresse de retículo endoplasmático.

Durante a exposição precoce a uma dieta rica em gordura saturada, células da micróglia localizadas no hipotálamo, tornam-se ativas e passam a expressar citocinas que, eventualmente, levam a ativação de vias inflamatórias em neurônios da região. A ativação de JNK e IKK em neurônios resulta na indução de resistência hipotalâmica à leptina e insulina, e, subsequentemente na perda do controle coordenado da ingestão alimentar e do gasto calórico. O fato de se observar ativação inflamatória no hipotálamo poucas horas após a exposição aos nutrientes desencadeadores sugere que células da micróglia residentes participem deste processo. Entretanto, com a manutenção da exposição ocorre uma modificação do padrão inflamatório ao longo do tempo, o que sugere que novas células estejam sendo recrutadas. Na primeira etapa deste estudo avaliamos a migração de células monocíticas da medula óssea para o hipotálamo em animais alimentados com dieta rica em gordura saturada. Para tal, transplantes de medula óssea foram realizados para gerar quimeras expressando

TLR4 funcional somente em células da medula óssea ou somente em tecidos não originários da medula óssea. A presença de TLR4 funcional em células de medula óssea foi necessária para expressão completa do fenótipo obeso. Além disso, somente quando TLR4 estava expresso em células da medula óssea, ocorreu infiltração hipotalâmica com células de micróglia oriundas da periferia.

Como o recrutamento de células monocíticas da medula óssea para um determinado sítio anatômico depende invariavelmente da expressão de quimiocinas, nós aventamos a hipótese de que nas etapas iniciais da ativação da inflamação hipotalâmica na obesidade alguma(s) quimiocina(s) poderia(m) desempenhar um papel determinante na progressão do processo inflamatório e, conseqüentemente do fenótipo obeso. Tanto humanos como animais experimentais não consanguíneos apresentam grande variabilidade na expressão fenotípica da obesidade quando expostos a condições ambientais que favoreçam a mesma. Desta forma, buscamos por diferenças no padrão de inflamação do hipotálamo e na expressão de quimiocinas em duas cepas de camundongos com perfis metabólicos e predisposição a obesidade diametralmente opostos, sendo eles: o camundongo Swiss, com grande predisposição a obesidade e diabetes; e, o camundongo Balb-c, virtualmente protegido da obesidade e dos distúrbios metabólicos afins.

Identificamos a quimiocina CX3CL1 (fractalkina) como aquela, dentre as avaliadas, com maior distinção de sua expressão no hipotálamo entre as duas cepas de camundongos, encontrando-se mais expressa em Swiss que em Balb-c. Na segunda parte do estudo mostramos que a expressão da fractalkina é induzida em neurônios do hipotálamo frente a um estímulo com nutrientes ricos em ácidos graxos saturados. Em cultura de neurônios, a expressão de fractalkina é induzida preferencialmente por $TNF\alpha$, mas também por palmitato. A inibição da fractalkina no hipotálamo com siRNA protege camundongos Swiss da intolerância à glicose e da obesidade induzidas por dieta rica em gordura

saturada, além de reduzir o recrutamento de células monocíticas originárias da medula óssea para o hipotálamo.

Assim, concluímos que durante as etapas iniciais da indução da obesidade, células da micróglia residentes ativam a produção de fractalkina por neurônios do hipotálamo a qual desempenha papel importante no recrutamento de novas células monocíticas da medula óssea, que perpetuam o processo inflamatório do hipotálamo caso a exposição à dieta rica em gordura saturada seja mantida. A fractalkina constitui-se, portanto, num dos mais precoces sinalizadores durante a instalação da inflamação hipotalâmica associada à obesidade.

Studies performed during the last 20 years have shown that obese subjects and experimental models of obesity present a systemic subclinical inflammation. Our group has shown that in experimental obesity the hypothalamus is affected by an inflammatory response and the employment of genetic and pharmacological means to inhibit diet-induced hypothalamic inflammation rescues the obese phenotype and the metabolic disarrangements commonly associated with obesity. Long-chain saturated fatty acids present in the diet are amongst the most important inducers of the hypothalamic inflammation in obesity. The first signs of hypothalamic inflammation can be detected as early as 24 h after the initial exposure to dietary fats. At least two molecular mechanisms have been shown to play a role in the induction of the hypothalamic inflammation in obesity; i.e., activation of TLR4 and induction of endoplasmic reticulum stress.

During the early exposition to dietary fats, resident microglia cells are activated and express cytokines that eventually can lead to the induction of inflammatory signaling in the neighboring neurons. The activation of JNK and IKK in neurons results in the induction of hypothalamic resistance to leptin and insulin and, thus, to the loss of the coordinated control of food intake and energy expenditure. As hypothalamic inflammation can be induced a few hours after the initial exposure to dietary fats, it has been suggested that resident microglia are involved in this process. However, as the exposure to dietary fats persists, changes in the pattern of inflammation take place, which may indicate the recruitment of new cells to the inflamed site. In the first part of this study, we evaluate the migration of bone marrow-derived monocytic cells to the hypothalamus of obese animals. Chimera mice were generated by the transplantation of TLR4-expressing bone marrow into TLR4 defective mice and vice-versa. The presence of functional TLR4 in bone marrow-derived cells was required for the complete

expression of the obese phenotype. In addition, diet-induced hypothalamic infiltration with bone marrow-derived microglia was obtained only in the presence of functional TLR4 in bone marrow-derived cells.

Because the recruitment of bone marrow-derived monocytic cells to a given anatomical site depends invariably on the expression of chemokines, we have raised the hypothesis that, during the initial steps of diet-induced hypothalamic inflammation a (some) chemokine (s) could play an important role in the progression of the inflammatory activity and, consequently, of the obese phenotype. Both humans and outbred experimental animals display a huge phenotypic variability whenever exposed to environmental conditions that favor obesity. With this concept in mind, we searched for differences in the patterns of hypothalamic inflammation in two strains of mice with different predispositions to obesity and metabolic diseases. The Swiss mice which are prone to obesity, and the Balb-c mice, which are protected from obesity and related metabolic conditions.

We identified the chemokine CX3CL1 (fractalkine) as the one, among those that we evaluated, with highest distinction on its hypothalamic expression levels between the two mouse strains; being increased in the hypothalamus of Swiss mice. In the second part of the study we demonstrate that fractalkine is induced in hypothalamic neurons by fat-rich diet. In culture, neurons express fractalkine in response to a $\text{TNF}\alpha$ stimulus preferentially, but also in response to palmitate. The inhibition of hypothalamic expression of fractalkine by siRNA protects mice from glucose intolerance and diet-induced obesity. Moreover, under hypothalamic fractalkine inhibition, diet-induced recruitment of monocytic cells from the bone marrow is severely impaired.

We conclude that during the initial steps of diet-induced hypothalamic inflammation, resident microglia cells induce the expression of fractalkine by neighboring neurons, which in turn recruit additional monocytic cells from the bone marrow to maintain the inflammatory process under continuous dietary

fatty acid exposure. Thus, fractalkine is one of the earliest signals generated in the hypothalamus during the installation of diet-induced obesity.

Lista de Abreviaturas

Siglas

AgRP	Peptídeo relacionado ao <i>agouti</i>
AIN-93G	<i>American Institute of Nutrition-93G</i>
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análises de variâncias
BDNF	<i>Brain derived neurofactor</i>
CCl2	Quimiocina ligante do tipo 2 ou Proteína quimiotática de monócitos do tipo 2
CCR2	Receptor de CCL2
CXCL8	Interleucina 8
CX3CL1	Fractalkina
CX3CR1	Receptor de fractalkina
CD45	Antígeno leucocitário comum
CART	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CD11b	Molécula de diferenciação presente em monócitos/macrófagos
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Meio de cultivo celular Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
ER	Estresse de retículo endoplasmático
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Soro fetal bovino)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F4/80	Glicoproteína de superfície celular de macrófagos ativados

GAPD	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
GPR78	<i>G protein-coupled receptor 78</i>
GPR94	<i>G protein-coupled receptor 94</i>
ICV	Intra-cérebro-ventricular
I κ B	Proteína inibitória de NF κ B
IKK	Complexo I κ B quinase
IL-8	Interleucina 8
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IP	Intra-peritoneal
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK2	Jannus Quinase 2
JNK	Quinase N-terminal c-jun
kDa	Quilodalton
Kg	Quilogramas
KO	<i>Knockout</i>
K _{IT}	Constante de decaimento da glicose
LPS	Lipopolissacarídeo
MCH	Hormônio concentrador de melanina
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B

NPY	Neuropeptídeo Y
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS 1X	Tampão fosfato salino 1X
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC θ	Proteína quinase c teta
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
POMC	Pro-opiomelanocortina
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1 beta
qPCR	PCR quantitativo
QR	Quociente respiratório
RNA	Ácido ribonucleico
SiRNA	<i>Small interference RNA</i> (RNA de interferência)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TLR4	Receptor do tipo <i>toll like 4</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador de tirotrofina
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VO ₂	Volume de oxigênio
VCO ₂	Volume de gás carbônico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS	37
CAPÍTULO 1 – Artigo referente à tese	38
CAPÍTULO 2 – Artigos resultantes de colaborações	75
CONCLUSÃO	78
APÊNDICE	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um acúmulo excessivo de gordura corporal levando à piora da qualidade de vida e a um risco aumentado de desenvolvimento de várias co-morbidades (1). Sua prevalência vem aumentando rapidamente em várias regiões do planeta e no ano de 2008 já existiam mais de 1,4 bilhões de adultos com sobrepeso no mundo, sendo o número de obesos em torno de 500 milhões (2). No Brasil, o número de indivíduos com obesidade ou sobrepeso já se aproxima de 30% do total da população (IBGE, 2010). Projeções para o ano de 2030 indicam que mais de 50% da população mundial (3,3 bilhões de pessoas) serão portadores de sobrepeso ou obesidade (2). Para fins de estratificação utiliza-se o índice de massa corporal (IMC), que consiste da divisão da massa corporal do indivíduo (Kg) pela altura (em metros) ao quadrado (A^2). Quando este índice é menor que 18,5 o indivíduo está abaixo do peso, entre 18,5 – 25,0 o indivíduo está com peso normal, entre 25,0 – 29,9 o indivíduo está sobrepeso e quando acima de 30, há obesidade, sendo classificada em grau I (30,0 a 34,9), grau II (35,0-39,9) ou grau III (a partir de 40,0). Entretanto, este índice não é capaz de diferenciar massa magra de gordura, e dessa forma alguns indivíduos com excesso de massa magra são classificados como sobrepeso ou com algum grau de obesidade. Isso demonstra que este índice apesar de bastante utilizado não reflete a realidade corporal do indivíduo.

Além de se confrontar constantemente com o preconceito sociocultural, que valoriza a extrema magreza como padrão de beleza, mesmo sabendo que esta não reflete o real estado de saúde do indivíduo, o obeso apresenta um risco maior para o desenvolvimento de outras doenças, como diabetes mellitus do tipo II, hipertensão arterial, dislipidemias, aterosclerose, esteatose hepática não alcoólica (podendo evoluir para cirrose) e até mesmo alguns tipos de câncer, sendo os mais

associados o câncer de cólon, de mama e de fígado (1). O eventual desenvolvimento de uma ou algumas destas comorbidades resulta não apenas em maior sofrimento humano, mas também em maior gasto com saúde pública. Portanto, existe a necessidade de se adotar políticas de saúde que tenham por objetivo prevenir o desenvolvimento da obesidade, além de ser de extrema importância a busca por fármacos ou outros métodos que possam ser utilizados para seu tratamento.

Hábitos sedentários de vida resultantes de atividades profissionais intelectuais aliados à baixa prática desportiva, além do aumento do consumo de dietas bastante calóricas, ricas principalmente em gorduras saturadas, são alguns fatores importantes para o aumento da prevalência da obesidade (3). Entretanto, o fenótipo obeso decorre não apenas dos fatores ambientais, mas da interação desses com algumas características genéticas. Sabe-se hoje que muitos genes estão envolvidos no desenvolvimento da obesidade, e que apenas esporadicamente a obesidade decorre da mutação de um único gene (4). Portanto, considera-se a obesidade como uma doença de etiologia multifatorial com uma série de predisponentes ambientais associados a vários determinantes genéticos.

Para que ocorra a manutenção da massa corporal em um indivíduo com massa corporal considerada normal, portanto IMC entre 18,5 – 25,0, é necessário que haja um equilíbrio entre consumo calórico (ingestão alimentar) e gasto energético (termogênese e atividade física). Caso o consumo calórico exceda o gasto energético, o indivíduo acumula o excedente na forma de gordura. Se esse desequilíbrio energético persistir, o quadro de obesidade irá se instalar. O hipotálamo é a região do cérebro que atua de forma mais importante na regulação da homeostase energética. Trata-se de uma região bastante pequena localizada na base do cérebro, com aproximadamente 4,0 cm³ em humanos. Dentre outras funções exercidas pelo hipotálamo destaca-se seu papel na regulação de respostas autonômicas como atividade de órgãos viscerais, temperatura corporal, sono e vigília, ingestão hídrica, diurese, secreção de hormônios e geração e regulação de ritmos circadianos (5).

O hipotálamo é dividido em três principais regiões responsáveis pelo controle da fome e saciedade: núcleo arqueado, hipotálamo lateral e núcleo paraventricular (6, 7). No núcleo arqueado encontram-se os neurônios de primeira ordem orexigênicos, que produzem os neurotransmissores NPY e AGRP, e os anorexigênicos, que produzem os neurotransmissores POMC e CART (7, 8). Esses neurônios emitem projeções para neurônios de segunda ordem encontrados no hipotálamo lateral, conhecido como centro da fome, e para neurônios de segunda ordem do núcleo paraventricular, também chamado de centro da saciedade. Os neurônios NPY, AGRP, POMC e CART apresentam receptores para os hormônios periféricos insulina e leptina (9). A insulina é liberada pelas células- β pancreáticas em resposta ao aumento de nutrientes circulantes, portanto em situações pós-prandiais. A leptina é liberada pelo tecido adiposo branco em proporção à massa corporal deste tecido.

A regulação da homeostase energética ocorre, resumidamente, da seguinte forma: em situações pré-prandiais, ou quando a massa de tecido adiposo é reduzida, as concentrações de insulina e leptina circulantes são baixas, sendo insuficientes para ativar seus receptores presentes nos neurônios do núcleo arqueado. Neste contexto, os neurônios NPY e AGRP emitem projeções excitatórias para os neurônios de segunda ordem presentes no hipotálamo lateral (centro da fome), secretores dos neurotransmissores orexina e MCH, aumentando a fome e diminuindo a termogênese respectivamente (8, 10, 11).

Já em situações pós-prandiais em que os estoques energéticos são satisfatórios, as concentrações de insulina e leptina circulantes aumentam chegando ao núcleo arqueado e ligando-se aos seus respectivos receptores neuronais. Nesta circunstância, os neurônios POMC e CART emitem projeções excitatórias para os neurônios de segunda ordem localizados no núcleo paraventricular (centro da saciedade), secretores de CRH e TRH, resultando na diminuição da fome e aumento da termogênese (6, 7, 11). É importante ressaltar que as vias de sinalização da insulina e leptina são

dependentes uma da outra, apresentando uma comunicação ou *cross-talk*, no nível intracelular. No hipotálamo a insulina estimula a transcrição dos neurotransmissores que irão inibir a fome e induzir a termogênese, contudo, essa transcrição é feita pela STAT3, uma proteína que atua como fator de transcrição, ativa somente na presença de leptina (12). Dessa forma, é imprescindível que o hipotálamo esteja responsivo a ambos os hormônios para que seja capaz manter a homeostase energética.

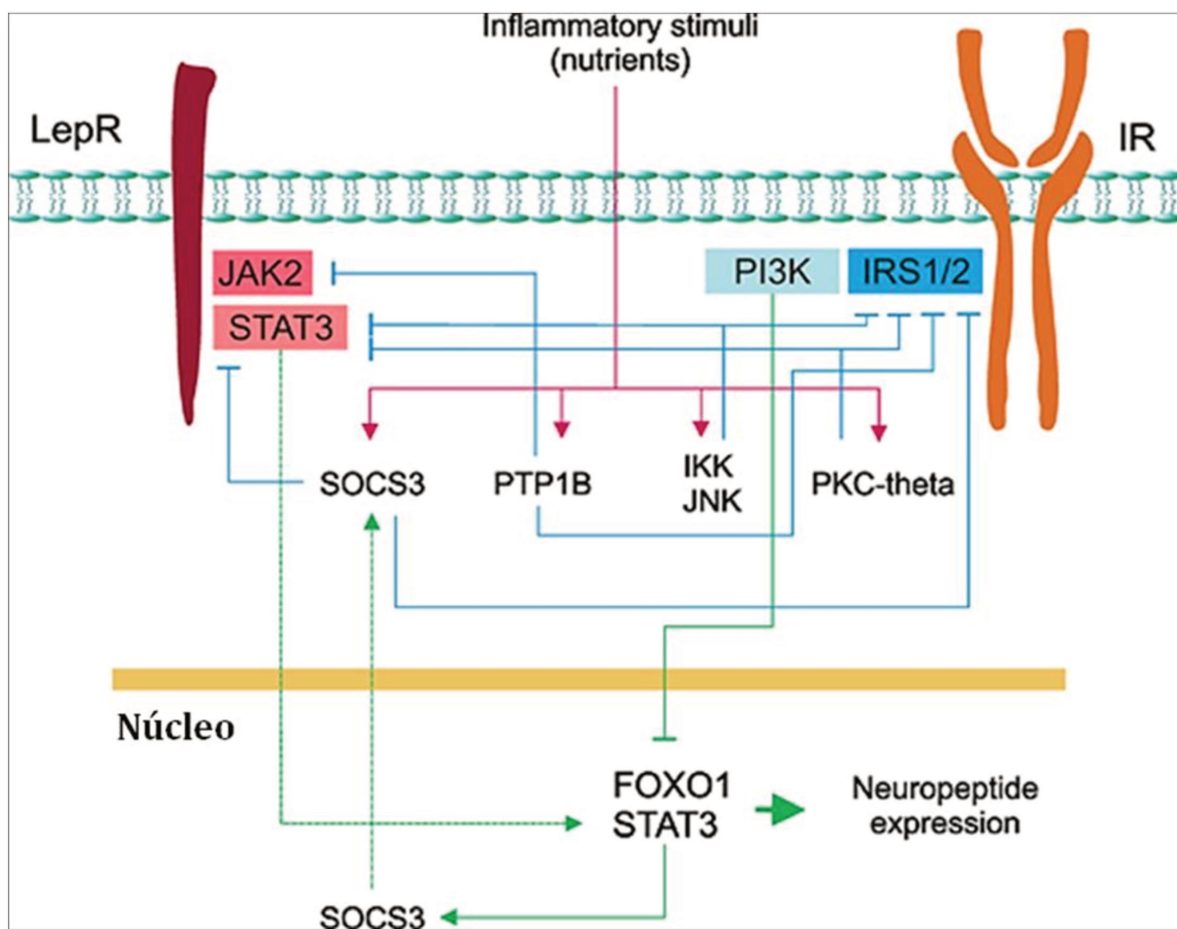
Entretanto, durante o desenvolvimento da obesidade desenvolve-se um fenômeno conhecido como resistência hipotalâmica à insulina e à leptina. A resistência a tais hormônios decorre de um quadro de inflamação no qual há um aumento dos níveis hipotalâmicos de citocinas, tais como, $TNF\alpha$, $IL1-\beta$ e $IL-6$, as quais são produzidas primordialmente por células do sistema imune inato presentes no hipotálamo, as células da micróglia (13, 14). A exposição de neurônios hipotalâmicos a estas citocinas resulta na ativação da sinalização inflamatória por meio da quinase c-Jun N-terminal (JNK) e a quinase do inibidor do $NF-\kappa B$ (IKK), o que por sua vez leva à inibição das vias de sinalização da leptina e insulina (15). Trata-se, portanto, de um mecanismo similar ao que resulta na resistência periférica à ação da insulina (15-17).

A resistência à ação da insulina em tecidos periféricos, induzida por um estado de inflamação subclínica associada à obesidade, já era conhecida há algum tempo (15, 18-20). O grupo do pesquisador Bruce Spiegelman, de Harvard, demonstrou em 1993, a indução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) do fator de necrose tumoral- α ($TNF-\alpha$) no tecido adiposo de modelos animais de obesidade e diabetes, além de aumento dos níveis locais e sistêmicos da proteína, cuja neutralização provocou um aumento significativo da captação periférica de glicose em resposta à insulina (20-22). Entretanto, somente em 2005 descreveu-se um fenômeno semelhante no hipotálamo (23). Cláudio de Souza e Eliana Araújo, na época pós-doutorandos no nosso grupo, estudaram o efeito da dieta sobre o

padrão de expressão gênica no hipotálamo de ratos, e demonstraram um aumento da expressão de proteínas de resposta inflamatória, como TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β) após 16 semanas de dieta hiperlipídica (23). Este fenômeno se acompanha da ativação de proteínas quinases sensíveis à inflamação, como a JNK e IKK. A JNK ativada catalisa a fosforilação em serina do IRS, reduzindo a ativação da PI3K/Akt, e a inibição farmacológica ou genética da JNK no hipotálamo de roedores restaura a sinalização da insulina (15, 24). A proteína IKK é expressa em neurônios do hipotálamo mediobasal, mas normalmente encontra-se inativa. Quando ativada, ela fosforila a I κ B, proteína que sequestra o NF- κ B (fator nuclear- κ B) no citoplasma, mantendo-o inativo. A I κ B fosforilada é degradada, liberando o NF- κ B para exercer suas ações. Este então transloca-se ao núcleo e leva à transcrição de genes inflamatórios (25, 26). A ativação desta via em camundongos leva à redução da sinalização da leptina e insulina no hipotálamo, resultando em hiperfagia e ganho de peso, enquanto sua supressão protege contra o desenvolvimento de obesidade (18, 23).

Outro mecanismo pelo qual a inflamação hipotalâmica provoca resistência local à leptina e à insulina é através da indução de proteínas como a SOCS3 (26-29) e a PTP1B (26, 30-32), que funcionam como inibidores endógenos e fisiológicos da sinalização por estes hormônios. A SOCS3 pode se ligar diretamente aos receptores ou suas proteínas sinalizadoras, inibindo-as ou facilitando sua degradação. A expressão de SOCS3 no núcleo arqueado do hipotálamo aumenta em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura (27). Foi demonstrado ainda que a deleção de SOCS3 especificamente em neurônios resulta em proteção contra a obesidade induzida por dieta (28, 30), enquanto a superexpressão de SOCS3 em neurônios POMC induz resistência à leptina, obesidade e intolerância à glicose (26, 29). A PTP1B inibe a sinalização pela leptina e pela insulina por desfosforilar o receptor de insulina, a JAK2 e outras moléculas sinalizadoras de ambas as vias (31). Sua expressão no hipotálamo aumenta em resposta à dieta hiperlipídica e à administração sistêmica

de $\text{TNF-}\alpha$, e a inibição da PTP1B no SNC resulta em resistência à obesidade induzida por dieta por melhorar a sensibilidade hipotalâmica à leptina e à insulina (30). Existe ainda outra proteína, a PKC- θ (proteína quinase C- θ), que pode mediar os efeitos deletérios da dieta rica em gordura sobre a sinalização adipostática central (33, 34). Demonstrou-se que a exposição ao ácido palmítico induz a ativação da PKC- θ , o que reduz a sinalização da insulina no hipotálamo. Já o *knockdown* desta proteína no núcleo arqueado melhora a sinalização da insulina local e a homeostase de glicose na periferia, além de atenuar o ganho de peso induzido pela dieta (33).



Velloso LA & Schwartz MW., 2013.

Figura 1. Mecanismos de inflamação hipotalâmica.

De acordo com os estudos apresentados acima, observa-se que a manipulação dos diversos mecanismos envolvidos na resistência à leptina e à insulina no hipotálamo é capaz de modificar a adiposidade. Isto sugere que as alterações hipotalâmicas não sejam apenas uma extensão da inflamação presente na periferia, mas que estejam envolvidas na gênese da obesidade em modelos animais. Outro achado que corrobora esta hipótese é o de que a inflamação associada à resistência aos hormônios adipostáticos no hipotálamo de roedores em resposta a uma dieta obesogênica precede o ganho de peso e a indução do processo inflamatório no tecido adiposo (35).

Entre os potenciais mecanismos primariamente envolvidos na conexão entre a exposição nutricional aos ácidos graxos e a inflamação hipotalâmica estão a ativação do *Toll-like receptor 4* (TLR4) e o estresse de retículo endoplasmático (ER) (36). O TLR4 é um receptor de membrana que faz parte do sistema imune inato, reconhecendo lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas. No SNC, sua expressão ocorre predominantemente em células da micróglia (37). A sinalização pelo TLR4, com indução de resposta inflamatória local, pode ser ativada pela injeção intracerebroventricular de ácidos graxos saturados de cadeia longa, mas não por ácidos graxos monoinsaturados (14). A deleção tanto do TLR4 quanto da proteína adaptadora MyD88, essencial à indução de citocinas pró-inflamatórias pelo TLR4, é capaz de proteger contra o desenvolvimento de resistência à insulina e à leptina e de obesidade induzida por dieta (38, 39). O excesso de nutrientes, particularmente ácidos graxos saturados, também pode desencadear um outro fenômeno chamado de Estresse de Retículo (ER), que por sua vez pode ativar vias inflamatórias (36, 40).

O retículo endoplasmático é responsável pela síntese, maturação e tráfico de uma série de proteínas. O enovelamento inadequado de proteínas recém-formadas pode ter consequências deletérias à célula, e seu acúmulo leva ao início de uma resposta adaptativa chamada UPR (*unfolded*

protein response), durante a qual a tradução global é reduzida, como parte de uma estratégia biológica que tem por objetivo sanar o problema (36). O ER parece desempenhar um papel fundamental na indução de resistência à leptina no hipotálamo. Inibidores do ER restauram a sensibilidade à leptina e levam à diminuição do peso em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura, enquanto a indução de ER em neurônios resulta em resistência à leptina e obesidade (41).

Os mecanismos pelos quais o ER é induzido na presença de dieta hiperlipídica não são bem compreendidos. Foi sugerido que os lipídios pudessem afetar diretamente a homeostase do retículo endoplasmático, através da alteração da composição da membrana desta organela e depleção de cálcio no seu interior (42). No entanto, em estudo realizado por Marciane Milanski, então doutoranda do nosso grupo, demonstrou-se que a inibição do TLR4 em animais submetidos a uma dieta rica em gordura ou que receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de ácidos graxos saturados é suficiente para melhorar o ER, sugerindo ser este um evento secundário à ativação do TLR4 (14). Além disso, em uma linhagem de células monocíticas, Andressa Coope, na sua tese de doutorado realizada em nosso laboratório, mostrou que a ativação persistente de sinalização por meio de TLR4 leva a uma exaustão da capacidade de tamponamento de proteínas no retículo endoplasmático devido a insuficiente produção de chaperonas, particularmente GPR94 e GPR78 (43).

Foi demonstrado recentemente em roedores que a dieta hiperlipídica pode estar associada ainda à perda de neurônios hipotalâmicos por apoptose (44). A ativação de proteínas apoptóticas tem maior relação com a composição da dieta do que com a quantidade de calorias consumidas e com o peso corporal (44). Além disso, há uma diferença nas subpopulações de neurônios afetadas entre animais que apresentam maior ou menor propensão ao desenvolvimento de obesidade e diabetes. Ratos *Wistar* apresentaram redução semelhante na expressão de neurotransmissores anorexigênicos e orexigênicos, enquanto camundongos *Swiss*, que se tornam obesos com maior facilidade,

apresentaram níveis diminuídos apenas do peptídeo anorexigênico POMC (44). Outro nível de regulação que pode ser importante no controle da homeostase de energia é a plasticidade sináptica. Foi reportado que a dieta e hormônios metabólicos periféricos podem influenciar a organização das conexões sinápticas entre os neurônios hipotalâmicos (45, 46). Alterações nestas conexões, juntamente com apoptose neuronal, podem estar relacionadas com a dificuldade em reverter completamente o aumento da adiposidade, mesmo com a cessação do estímulo que originou a inflamação hipotalâmica (47).

As células que compõem o sistema nervoso central podem ser divididas em dois grandes grupos: neurônios e neuroglia. Os neurônios são as unidades fundamentais, com função de receber, processar e enviar informações. Já a neuroglia é composta por células com funções de sustentação; revestimento; modulação da atividade neuronal e defesa. Vários tipos celulares são encontrados na neuroglia, sendo eles astrócitos, oligodendrócitos, microgliócitos e as células endoteliais. Os microgliócitos ou micróglia são os macrófagos do SNC, portanto, as células do sistema imune desse tecido, com função protetora (48). São células pequenas, alongadas e com poucos prolongamentos (48). Além de fagocitar e destruir antígenos que poderiam causar danos às células, também apresentam uma função na construção do cérebro em recém-nascidos, atuando na maturação de circuitos sinápticos e em seus remodelamentos (49). Neste sentido, investiga-se se defeitos no funcionamento da micróglia nesta fase inicial da vida poderia ter algum papel no surgimento de doenças neurológicas como autismo, esquizofrenia, Alzheimer e Parkinson (50).

Além da micróglia, alguns macrófagos também estão infiltrados no SNC e o que os diferencia é que a micróglia apresenta dois receptores específicos, CX3CR1^{hi} e CD45^{low}, enquanto os receptores F4/80, CD11b e até mesmo o TLR4 são comuns a ambos tipos celulares (50). Podemos encontrar os seguintes tipos de macrófagos no SNC: macrófago perivascular, presente nos vasos sanguíneos de

pequeno calibre próximos à superfície do crânio; macrófago das meninges, frequentemente substituído; macrófago do plexo coroide, presente na interface entre o sangue e o fluido cefalorraquidiano (51).

A micróglia apresenta uma menor frequência de reposição em comparação com esses tipos de macrófagos. Para ser repostada, a micróglia pode proliferar *in situ* a partir de regiões que apresentam este tipo celular ainda não totalmente diferenciado, ou a partir de monócitos periféricos circulantes que podem atravessar a barreira hematoencefálica, diferenciando-se em micróglia (52, 53). Essa última alternativa é ainda controversa, pois alguns estudos sugerem que monócitos não ultrapassariam esta barreira, e que a micróglia seria originada a partir de macrófagos do saco vitelínico durante a embriogênese, e não de células precursoras da medula, como os monócitos (54). Em contrapartida, animais que sofrem irradiação e transplante de medula óssea apresentam células diferenciadas em micróglia provindas de seu doador (55), gerando questionamentos a respeito da possível ruptura da barreira hematoencefálica em decorrência da irradiação.

A dinâmica temporal e o padrão de ativação da resposta inflamatória no hipotálamo durante as fases iniciais da obesidade (35) sugerem que células residentes da micróglia sejam as primeiras a detectar a presença de níveis elevados de ácidos graxos saturados, dando início à resposta imune. Entretanto, ao persistir o estímulo, o padrão de resposta inflamatória sofre modificações no seu curso e intensidade (14, 35). Portanto, é possível que ocorram integrações da sinalização inflamatória entre diferentes células do hipotálamo e/ou recrutamento de novas células para a região. Na primeira parte deste estudo nós testamos a hipótese de que células monocíticas originárias da medula óssea seriam recrutadas para o hipotálamo para compor o corpo de células da micróglia envolvidas no desenvolvimento da resposta inflamatória durante a instalação e progressão da obesidade. Para tal, realizamos transplante de medula óssea em animais que apresentam mutação com perda de função

do gene *tlr4*. Esses animais, C3H/HeJ, quando alimentados com uma dieta hiperlipídica não ganham peso e não apresentam inflamação hipotalâmica da mesma forma que o seu *background*, C3H/Hepas. Irradiamos os C3H/HeJ e pela veia da cauda injetamos a medula óssea de C57BL/6 GFP. Após a recuperação dos animais, os submetemos à uma dieta hiperlipídica e observamos a presença de células GFP em seus hipotálamos. Realizamos novamente o mesmo experimento, mas agora injetando medula óssea de animais C3H/Hepas (*background*) nos mutantes C3H/HeJ. Os animais transplantados (C3H/HeJ) também se alimentaram de uma dieta hiperlipídica e ficaram obesos, além de apresentarem inflamação hipotalâmica. Assim, quimeras expressando TLR4 funcional somente nas células originárias da medula óssea se tornam suscetíveis a obesidade e inflamação hipotalâmica induzida por dieta, enquanto quimeras expressando TLR4 não funcional somente nas células originárias da medula óssea são protegidos da obesidade e inflamação hipotalâmica induzida por dieta. Desta forma, concluímos que células originárias da medula óssea e expressando TLR4 funcional participam do processo que leva à definitiva instalação da inflamação hipotalâmica induzida por dieta, e desempenham papel central na gênese da obesidade experimental.

Os resultados obtidos na primeira parte do estudo geraram novas questões: uma vez que células oriundas da medula óssea são necessárias para a expressão completa do fenótipo de inflamação hipotalâmica associado à obesidade, quais seriam os fatores envolvidos no recrutamento destas células para o hipotálamo e qual seu eventual papel na gênese da obesidade?

Tanto humanos como animais experimentais não consanguíneos apresentam grande variabilidade na expressão fenotípica da obesidade quando expostos a condições ambientais que favoreçam a mesma. Desta forma, buscamos por diferenças no padrão de inflamação do hipotálamo e na expressão de quimiocinas em duas cepas de camundongos com perfis metabólicos e predisposição a obesidade diametralmente opostos, sendo eles: o camundongo Swiss, com grande predisposição a

obesidade e diabetes; e, o camundongo Balb-c, protegido da obesidade e dos distúrbios metabólicos afins.

O camundongo Swiss (*Swiss albinus*) desenvolve uma intolerância à glicose mesmo quando em dieta padrão (ração), e quando em dieta hiperlipídica fica rapidamente obeso e resistente à insulina e à leptina, tornando-se diabético. Esse camundongo desenvolve ainda inflamação hipotalâmica em consequência da dieta hiperlipídica (17). O camundongo Balb-c diferentemente do camundongo Swiss, não apresenta ganho de peso expressivo quando em dieta hiperlipídica (56) e é mais sensível à glicose, não apresentando diabetes tipo II. Procedemos a caracterização dos modelos animais, e observamos diferenças metabólicas entre eles, como já era esperado. Com relação à expressão gênica hipotalâmica, encontramos um gene de uma quimiocina que apresentou diferença na sua expressão entre os dois modelos. Esse gene foi o *cx3cl1* que codifica a proteína CX3CL1 (fractalkina).

O nome quimiocina significa citocina quimioatraente. As quimiocinas fazem parte do maior grupo de citocinas até agora identificado, sendo responsáveis pelo recrutamento e ativação de leucócitos em processos inflamatórios; pela adesão celular e até mesmo neurogênese (57). Há aproximadamente vinte e cinco anos atrás foi descoberta a primeira quimiocina, a IL-8 (interleucina 8)/CXCL8, um fator quimiotático de neutrófilos (58). Até o momento já foram descritas por volta de cinquenta quimiocinas e vinte receptores (59). Esse número elevado de quimiocinas existente reflete a importância dessas moléculas para a homeostase do sistema imune (60).

Existem dois grupos de quimiocinas, as inflamatórias que recrutam leucócitos em resposta a estresse fisiológico (infecções, por exemplo) a fim de que essa inflamação seja contida; e as homeostáticas, que são responsáveis pela manutenção do tráfego de leucócitos e pela formação da arquitetura de órgãos linfóides secundários - linfonodos, baço, medula óssea (61, 62). As quimiocinas são produzidas nos tecidos por diversos tipos de células em resposta a agentes inflamatórios,

antígenos ou citocinas, e geralmente seus receptores encontram-se nos leucócitos (60). Dessa forma, podem regular os processos inflamatórios ou perpetuá-los através do constante recrutamento e ativação de leucócitos. São proteínas bem pequenas (8-14kDa), bastante conservadas ao longo da evolução, com a presença quase ubíqua de quatro cisteínas. Foram classificadas em quatro grupos segundo o número ou rearranjo de cisteínas na cadeia peptídica: CXC; CC; XC e CX3C. CXC representa que as cisteínas foram separadas por 1 aminoácido; CC que as duas cisteínas são adjacentes; XC que a proteína apresenta apenas duas cisteínas; e por fim, CX3C em que as duas primeiras cisteínas são separadas por 3 aminoácidos. Este último grupo é composto por uma única quimiocina, a CX3CL1 (57).

A CX3CL1 foi descoberta no fim dos anos 90, inicialmente chamada de neurotactina. Apresenta 373 aminoácidos, sendo expressa em fibroblastos, células endoteliais, dendríticas e no SNC em neurônios. Pode ser sintetizada como proteína de membrana, apresentando um domínio transmembrana em forma de alfa-*helix*, um domínio extracelular rico em resíduos de mucina, e uma cauda intracelular bastante curta; ou solúvel. A forma transmembrana tem função na adesão de leucócitos, principalmente ao endotélio inflamado (63). Já a forma solúvel apresenta função quimiotática para monócitos, células natural *killer* e linfócitos T (64). Todas as quimiocinas, inclusive a CX3CL1, exercem suas funções através de sua ligação a receptores específicos, que apresentam sete domínios transmembrana e são acoplados à proteína G. São classificados segundo o grupo de quimiocinas que a eles se ligam, sendo eles CXCR; CCR; XCR e CX3CR. Geralmente cada quimiocina se liga apenas a receptores de seu grupo, por exemplo, a CCL2 (MCP-1) se liga ao receptor CCR2, mas também ao CCR11. Portanto, uma quimiocina pode se ligar a mais de um receptor, mas este deve ser restrito ao seu grupo. Da mesma forma, um receptor pode ter vários ligantes, mas restritos ao seu grupo (57).

A participação de quimiocinas no desenvolvimento de algumas doenças vem sendo amplamente estudada, sendo relacionadas à distúrbios alérgicos (65, 66), dermatites (67), aterosclerose (68, 69), diabetes mellitus tipo II e obesidade (70). Um estudo relatou que na ausência de expressão de MCP-1 (uma quimiocina que estimula a infiltração de monócitos para regiões inflamadas) ou de seu receptor (CCR2), camundongos ficam protegidos do desenvolvimento de aterosclerose (71). Outros estudos mostram que a CX3CL1 também está envolvida na formação inicial das placas de ateroma por aumentar a ativação, adesão e infiltração de monócitos nessas regiões (69, 72). Além da formação da placa aterosclerótica, a CX3CL1 também parece estar envolvida em seu rompimento. Acredita-se que a CX3CL1 aumente a infiltração de monócitos nessas regiões de placas, culminando numa ativação exagerada da resposta imune por estas células, ocorrendo a ruptura (73).

A participação de quimiocinas no desenvolvimento do processo inflamatório em obesidade e diabetes também já foi estudada em alguns contextos. Já se sabia que o aumento de MCP-1 no tecido adiposo de obesos era responsável pelo recrutamento de leucócitos a essas regiões, colaborando para a inflamação deste tecido e para o desenvolvimento da resistência à insulina (70). Entretanto, a ausência de MCP-1 não foi suficiente para limitar a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, sugerindo que outras quimiocinas estariam envolvidas neste processo (74). Outro estudo (70) mostrou que a CX3CL1 pode ser uma das quimiocinas responsáveis pela infiltração de macrófagos no tecido adiposo, visto que indivíduos obesos apresentam um aumento desta quimiocina neste tecido. Além disso, o estudo também revelou que a concentração plasmática de CX3CL1 está aumentada em indivíduos diabéticos.

As quimiocinas também estão presentes no SNC. A CX3CL1 é produzida por neurônios e se liga ao seu receptor CX3CR1 presente na micróglia (75). O RNAm do gene *cx3cl1* está presente em diversas regiões do SNC, como hipocampo, córtex, bulbo olfatório, hipotálamo, dentre outras (76).

Como mostrado em estudo anterior (49), o *crosstalk* entre neurônio e micróglia, através da sinalização CX3CL1/CX3CR1 é importante na plasticidade sináptica e seus remodelamentos durante a maturação do sistema nervoso central. Ainda, a atividade biológica da CX3CL1 é dependente do equilíbrio entre suas formas transmembrana e solúvel, o que pode repercutir na sobrevivência ou morte neuronal (77). Além disso, CX3CL1 controla algumas funções da micróglia através de seu receptor CX3CR1, como a mobilização de Ca^{2+} intracelular, quimiotaxia, inibição da apoptose e das vias inflamatórias deflagradas por LPS (78).

Em decorrência dessa atuação importante no SNC, a CX3CL1 está relacionada a algumas doenças próprias desta região anatômica, sendo elas em geral inflamatórias e degenerativas. Sabe-se que a MCP-1 e a CX3CL1 tem papel no desenvolvimento da esclerose múltipla e da doença de Alzheimer (57, 78). Nessas doenças, o que se observa é que tanto MCP-1 quanto a CX3CL1 estão expressas em níveis superiores à normalidade e aparentemente colaboram para a ativação da micróglia. É possível ainda que participem dos mecanismos que resultem na infiltração de monócitos e linfócitos, colaborando para a manutenção da inflamação. Além disso, a concentração plasmática destas proteínas também é maior em indivíduos acometidos por estas doenças (78).

Além de estar presente nas doenças do SNC citadas acima, a CX3CL1 também parece ter um papel em mediar a dor neuropática. A dor neuropática pode ocorrer quando a micróglia reconhece algum patógeno, liberando substâncias responsáveis pela transmissão de estímulos de dor através dos neurônios, como óxido nítrico (NO), leucotrienos, prostaglandinas. Adicionalmente, a micróglia também passa a liberar proteínas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6, as quais são reconhecidas pelos neurônios e estimulam a clivagem de CX3CL1 presente na membrana neuronal, deixando-a na forma solúvel (79) e pronta para se ligar ao seu receptor CX3CR1 presente na micróglia. Essa ligação que ocorre na micróglia, entretanto, ocorre em regiões de dor, exacerbando-a (80).

Sabendo que a CX3CL1 tem um importante papel em algumas doenças inflamatórias e degenerativas do SNC, e tendo conhecimento da relação existente entre inflamação e a obesidade, o segundo objetivo deste estudo foi avaliar o papel da quimiocina CX3CL1 no hipotálamo de animais propensos e resistentes ao desenvolvimento da obesidade quando desafiados com uma dieta hiperlipídica. Acreditamos que ao caracterizar mecanismos geneticamente envolvidos com a predisposição ao desenvolvimento dessa doença, contribuiremos para a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública mundial. Sua alta prevalência decorre de alterações em aspectos comportamentais como alimentação e sedentarismo, associados com alguns fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento desta doença. Além disso, indivíduos obesos têm grande dificuldade de efetuar alterações comportamentais a fim de reverter o quadro, contribuindo assim para o crescimento dessa doença. Assim, acreditamos que ao compreendermos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade contribuiremos para a identificação de novos potenciais alvos para a abordagem terapêutica.

- Testar a hipótese de que células oriundas da medula óssea são necessárias para instalação da inflamação hipotalâmica associada à obesidade.
- Investigar citocinas e quimiocinas expressas no hipotálamo que possam estar potencialmente envolvidas no recrutamento de células do sistema imune para esta região anatômica durante a instalação da obesidade.
- Avaliar o papel da fractalkina como fator envolvido na instalação e manutenção do quadro de inflamação hipotalâmica na obesidade e seu impacto na progressão do fenótipo obeso.

O ARTIGO

Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity

Encontra-se submetido para publicação

Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity

Joseane Morari¹, Gabriel F. Anhe², Lucas F. Nascimento¹, Rodrigo F. de Moura¹, Daniela Razolli¹, Carina Solon¹, Dioze Guadagnini³, Gabriela Souza¹, Alexandre H. Mattos⁴, Vinicius D. Pascoal⁴, Mario J. Saad³, Iscia Lopes-Cendes⁴, Juliana C. Moraes¹, Licio A. Velloso¹

¹Laboratory of Cell Signaling, ²Department of Pharmacology, ³Laboratory of Experimental Endocrinology, ⁴Department of Medical Genetics, University of Campinas, Brazil

Correspondence should be addressed to Licio A. Velloso – Laboratory of Cell Signaling, Faculdade de Ciencias Medicas da Universidade Estadual de Campinas, 13084 970, Campinas SP – Brazil. E-mail – lavelloso.unicamp@gmail.com

Abstract

Hypothalamic inflammation is a common feature of experimental obesity. Dietary fats are important triggers of this process inducing the activation of toll-like receptor-4 signaling and endoplasmic reticulum stress. Microglia cells, which are the cellular components of the innate immune system in the brain, are expected to play a role in the early activation of diet-induced hypothalamic inflammation. Here, we use bone marrow transplants to generate mice chimeras that express a functional TLR4 in the entire body except in bone marrow-derived cells or only in bone marrow-derived cells. We show that a functional TLR4 in bone marrow-derived cells is required for the complete expression of the diet-induced obese phenotype and for the perpetuation of inflammation in the hypothalamus. In an obesity-prone mouse strain, the chemokine CX3CL1 (fractalkine) is rapidly induced in the neurons of the hypothalamus following the introduction of a high-fat diet. The inhibition of hypothalamic fractalkine reduces diet-induced hypothalamic inflammation and the recruitment of bone marrow-derived monocytic cells to the hypothalamus; in addition, this inhibition reduces obesity and protects against diet-induced glucose intolerance. Thus, fractalkine is an important player in the early induction of diet-induced hypothalamic inflammation, and its inhibition impairs the induction of the obese and glucose-intolerance phenotypes.

Introduction

A complex network of neurons that are responsive to hormonal, neural and nutritional cues tightly regulates body adiposity (1; 2). Cells of the medium-basal hypothalamus act as first-order neurons in this system, and many genetic, pharmacological and environmental approaches that lead to the damage or loss of some of these neurons can impact body energy homeostasis (1-3). In many experimental models, hypothalamic dysfunction that results from local inflammation plays a central role in the pathogenesis of obesity (4-8). In addition, recent studies using neuroimaging have provided strong evidence for the existence of inflammation and dysfunction in the hypothalamus of obese humans (9; 10).

Dietary long-chain saturated fatty acids are the main triggers of hypothalamic inflammation in obesity (5). These fatty acids act through TLR4 (5) and induce endoplasmic reticulum stress (5; 6), which leads to the activation of intracellular inflammatory signaling pathways through JNK, NF κ B and PKC- θ (4; 6; 11). The increased hypothalamic expression of inflammatory cytokines is detectable as early as one day after the introduction of a fat-rich diet to rodents (10). Upon prolonged high-fat feeding, signals of cellular damage become evident, such as gliosis (10), apoptosis (12) and defects in the potential for neurogenic recovery (13). Thus, diet-induced hypothalamic inflammation follows a classical path of the inflammatory response, which is detectable a few hours after the exposure to the threatening stimulus, and progresses with a wide array of damaging/recovering outcomes (14; 15).

An important missing link between the exposure to dietary fats and the induction and perpetuation of inflammation in the hypothalamus is the definition of which cells first sense the presence of the fatty acids and which cells can effectively generate and maintain the inflammation. In at least one study, hypothalamic neurons were unable respond to palmitate producing cytokines (16). Thus, glial cells, particularly microglia, may be an important requirement of the system. In other inflammatory conditions of the central nervous system, the

activation of microglia plays an important role in the progression of disease (17). Both resident and bone-marrow derived monocytic cells can, to a variable degree, exert the inflammatory and immunosuppressive actions that are frequently observed in chronic neuroinflammatory conditions (17). The recruitment and activation of microglia to the site of damage depends on the expression of chemokines and their receptors (18). Fractalkine (CX3CL1) is one of the most important chemokines that are involved in the regulation of neuroinflammatory conditions (18; 19). In this context, fractalkine is produced and released by neurons, acting as mediator in their talk with glial cells (18; 19).

In the present study, we first show that bone-marrow derived cells are involved in the activation of diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Next, we show that saturated fatty acids induce an early expression of fractalkine in hypothalamic neurons and that the inhibition of this chemokine reduces diet-induced hypothalamic inflammation and body mass gain in an obesity-prone strain of mice.

Materials and Methods

Experimental Animals. Six-week-old (four-week-old for mice that underwent bone marrow transplantation) male Swiss, Balb-c, TNFRp55^{-/-}, TNFRp55^{+/?}, C3H/HeJ, C3H/HeN, IL10^{-/-} or IL10^{+/?} mice were used in this study, which was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas. Mice were housed in individual cages under a controlled temperature (23±2°C), 12 h light/dark cycles and water and food *ad libitum*. In some experiments, mice were randomly selected for feeding on chow or a high-fat diet (HFD) (Table 1) for 2-8 weeks. In some experiments, mice were stereotactically instrumented using a Stoelting stereotaxic apparatus set on the following coordinates: anteroposterior, 0.0 mm; lateral, 0.0 mm; and depth, 4.8 mm. Single doses of an siRNA (SI) against fractalkine or a scrambled control (SC) were delivered through the cannula, which was immediately withdrawn. The adequacy of the cannulation procedure was ascertained by randomly selecting some animals for

methylene blue injection and posterior anatomical evaluation and by the capacity of the siRNA to inhibit the expression of fractalkine only near the injection site, which was the hypothalamus, and not in other regions of the brain. In the experiments employing Swiss mice, which is an outbreed strain, only obesity-prone animals were included in the study. These animals were selected as the top 25% that ingested the highest amount of calories in a 24-h spontaneous food-intake test.

Cell culture. The neuron cell-line, mHypoA 2/29 CLU189 (20), was cultivated in DMEM containing 25mmol/l glucose and 10% fetal bovine serum to reach 70% confluence. The cells were exposed to either palmitate or TNF α according to doses and times as described in the results section. After incubation the cells were harvested for RNA preparation for real-time PCR. The macrophage cell-line, Raw 264.7 (21), was cultivated in DMEM containing 11 mmol/l glucose and 10% fetal bovine serum. The cells were exposed to either palmitate or TNF α according to doses and times as described in the results section. After incubation the cells were harvested for RNA preparation for real-time PCR.

Bone marrow transplantation. During the preparation for radiation, mice were treated with a daily dose of sulfamethoxazole (4.0 mg/kg) plus trimethoprim (0.8 mg/day) for four days. A sublethal dose of radiation (8 Gy) was used, and after 2 h, the mice received an intravenous (tail vein) injection of a bone marrow cell preparation that contained 5.0×10^6 cells. The details of the protocol were previously published (22).

Small interfering RNA (siRNA) treatment. An siRNA that targeted fractalkine (sense: GCC GCG UUC UUC CAU U; antisense: ACA AAU GGA AGA ACG C) and a scrambled (sense: CAG GCU ACU UGG AGU G; antisense: AUA CAC UCC AAG UAG C) siRNA were designed, as previously described (23). The molecules were complexed and were diluted similarly to a method previously described (24).

Blood biochemistry, hormone and cytokine determination. Glucose concentrations were determined in blood using a glucometer from Abbott (Optimum, Abbott Diabetes Care, Inc., Alameda, CA, USA). Serum insulin and leptin levels were determined using ELISA kits from Millipore (Billerica, MA, USA).

Hyperinsulinemic–euglycemic clamp. Glucose consumption was assessed after a 12-h fast, when the mice were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) that was injected ip, and catheters were placed in the left jugular vein (for tracer infusions) and the carotid artery (for blood sampling), as previously described (25). A primed continuous insulin infusion at a rate of 3.6 mU/kg body weight/min was performed to raise the plasma insulin concentration to approximately 800–900 pmol/l. Plasmatic glucose concentrations were measured in blood samples at 5-min intervals, and 10% unlabeled glucose was then infused at variable rates to maintain the plasma glucose at fasting levels. Blood samples were collected before the start and during the glucose infusion period (every 30 min) for the measurement of plasma insulin concentrations. All infusions were performed using Harvard infusion pumps.

Immunoblotting. Liver specimens were homogenized by sonication (15s) in an anti-protease cocktail (10 mmol/l imidazole, pH 8.0, 4 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 0.5 g/l pepstatin A, 2 g/l aprotinin, 2.5 mg/l leupeptin, 30 mg/l, trypsin inhibitor, 200 μ mol/l DL-dithiothreitol and 200 μ mol/l phenylmethylsulfonyl fluoride). After sonication, an aliquot of the extract was collected and the total protein content was determined by the dye-binding protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Samples containing 50–125 μ g of protein from each experimental group were incubated for 5 minutes at 80°C with 4x concentrated Laemmli sample buffer (1 mmol sodium phosphate/l, pH 7.8, 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 10% SDS, 2% mercaptoethanol) and then run on 10% polyacrylamide gels at 120 V for 30 min. Electrotransfer of proteins to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) was performed for 1h at 120V (constant) in buffer containing methanol and SDS. After checking the efficiency of transfer by staining with Ponceau S, the membranes were blocked with 5% skimmed

milk in TTBS (10 mmol Tris/l, 150 mmol NaCl/l, 0.5% Tween 20) overnight at 4°C. Ser-473 phospho-Akt was detected in the membranes after a 2-h incubation at room temperature with primary antibodies (pAKT sc7985-R - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (diluted 1:500 in TTBS containing 3% dry skimmed milk). The membranes were then incubated with a secondary specific immunoglobulin G antibody (diluted 1:5000 in TTBS containing 3% dry skimmed milk) for 2h at room temperature. Loading was evaluated by reblotting the membranes with an anti-Akt antibody (sc8312, Santa Cruz Biotechnology). Enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Pierce) after incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used for detection by autoradiography. Band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image, Frederick, MD).

Flow cytometry. Single cells from the hypothalamus were prepared according to a protocol that was previously published (26). To examine the colocalization of F4/80 and CD206, 1.0×10^5 hypothalamic cells (100 μ l) were washed with phosphate-buffered saline [PBS; 50 mmol/L of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5 mmol/l of KCl; 1.5 mmol/l of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; and 80.1 mmol/l of NaCl; pH 7.4] and were incubated with PerCP-conjugated anti-F4/80 and AlexaFluor 488-conjugated anti-CD206 (BioLegend, San Diego, CA, USA) for 1 h in the dark at room temperature and were subsequently analyzed using a Becton-Dickinson FACSCalibur Cytometer (San Jose, CA, USA) with the CellQuest Pro software (Becton-Dickinson). F4/80 and CD206 fluorescent signals were acquired in the FL3 and FL1 channels, respectively. The gating strategy was performed as follows: FL3 fluoresce of an unstained sample was adjusted to the lower left quadrant of an FL3 compared with FL1 dot plot. Next, the fluorescent signal of a sample that was stained only with anti-F4/80 antibody was acquired, and the events that were in the lower left quadrant (unstained events) were represented in an FSC vs. SSC dot plot. Finally, a gate was placed in the FSC vs. SSC dot plot to exclude at least 90% of the F4/80 negative cells. FL1 and FL3 fluorescence were analyzed in events that were located within this gate. The colocalization of F4/80 with CD206 was determined by assessing

the fraction of events that were localized in the upper right quadrant of an FL1 vs. FL3 dot-plot graph, respectively.

Real-time PCR. TNF α , IL1 β , MCP-1, CCR2, CX3CL1, CX3CR1, CD11b, CD36, CD163 and TLR4 mRNAs were measured in hypothalamus or cell culture by Real Time PCR (ABI Prism 7500 detection system - Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). The intron-skipping primers were obtained from Applied Biosystems, TNF α – Mm00443258_m1, IL1 β – Mm00434228_m1, MCP-1 - Mm99999056_m1, CCR2 - Mm00438270_m1, CX3CL1 - Mm00436454_m1, CX3CR1 - Mm00438354_m1 CD11b - Mm00434455_m1, CD36 - Mm01135198_m1, CD163 - Mm00474091_m1, and TLR4 - Mm00445273_m1. GAPDH (Applied Biosystems) was used as endogenous control, #4352339E. Each PCR contained 40 ng of reverse-transcribed RNA, 0.25 μ l of each specific primer, Taqman Universal master mix # 4369016, and RNase free water to a 10 μ l final volume.

Immunofluorescence staining. For histological evaluation, hypothalamic tissue samples were fixed in paraformaldehyde (4% final concentration in PBS) and processed routinely for embedding in a paraffin block. The samples were submitted to dehydration (alcohol at 70%, 80%, 90%, 95%, and absolute alcohol) being diaphanized by immersion in xylol and embedded in paraffin. Subsequently, the hydrated (alcohol at absolute, 95%, 90%, 80%, and 70% concentrations) 5.0 μ m paraffin sections were processed for immunofluorescence staining using the following primary antibodies: F4/80 (sc25830), CD11b (sc28664), CD11c (sc26693), Iba1 (sc28530), GFP (sc5385), AgRP (sc18634), (all from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); fractalkine (CX3CL1) (#ab25088, from Abcam, Cambridge, MA, USA), and the secondary antibodies conjugated to FITC or rhodamine (sc2777; sc2092, respectively - Santa Cruz Biotechnology). In some experiments, the neuron cell-line, mHypoA 2/29 CLU189 was cultivated in glass slides for further fixation in 4% paraformaldehyde and preparation for indirect immunofluorescence staining with anti-AgRP and anti-fractalkine antibodies. The images were obtained using a Confocal Laser Microscopy (LSM510, Zeiss, New York, NY).

Statistical analysis. Results are presented as means $\pm$ SE. Levene's test for the homogeneity of variances was initially used to check the fit of data to the assumptions for parametric analysis of variance. When necessary, to correct for variance heterogeneity or non-normality, data were log-transformed (27). All results were analyzed by *t*-test or One-way ANOVA and complemented by the Tukey test to determine the significance of individual differences. The level of significance was set at $p < 0.05$. The data were analyzed using Statistic for Windows, 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Results

TLR4-expressing bone marrow-derived monocytic cells are required for the induction of the obese phenotype in high-fat feeding. A deficiency of TLR4 protects against diet-induced hypothalamic inflammation and obesity (5). In the central nervous system, TLR4 is predominantly expressed in microglia cells (28), which potentially place these cells in a pivotal position as triggers of hypothalamic inflammation in obesity. Here, we performed bone-marrow transplants to generate chimeras that expressed functional TLR4 in all cells of the body except those derived from the bone marrow and chimeras that expressed functional TLR4 only in bone marrow-derived cells. Figure 1A depicts the protocol that was employed to generate the chimeras and controls, and Figure 1B depicts PCR-amplified, BstOI-digested fragments that were generated from transcripts of TLR4-deficient and functional TLR4-expressing cells, which were used to monitor the efficiency of the transplants at 6 weeks of age. Four weeks on a HFD leads to the activation of microglia only in mice that express a functional TLR4 (Fig. 1C). However, chimeras that only express a functional TLR4 (and GFP) in bone marrow-derived cells present a hypothalamic infiltration of active microglia cells upon high fat feeding (Fig. 1D). Chimeras that only express non-functional TLR4 in bone marrow-derived cells are protected from diet-induced obesity (Fig. 1E-1H), whereas

chimeras that only express functional TLR4 in bone marrow-derived cells adopt the obese phenotype with a deposition of fat in the visceral territory (Fig. 1E-1H).

Fractalkine is induced in hypothalamic neurons of obesity-prone but not of obesity-protected mice. To investigate chemokines and other inflammatory factors that are potentially involved in the hypothalamic recruitment of bone marrow-derived monocytic cells during the induction of obesity, we compared an obesity-prone strain, the Swiss mouse, and an obesity-protected strain, the Balb-c mouse. Figures 2A-2L depict the main metabolic and endocrine differences between the two strains. Balb-c mice are completely protected from diet-induced body mass gain (Fig. 2A-2B). Except during the first two weeks when Swiss mice that are fed a HFD have increased caloric intake, the caloric intake is rather similar between the groups (Fig. 2C). However, Balb-c mice that are fed the HFD present increased energy expenditure (Fig. 2D-2F). In addition, Balb-c mice that are fed the HFD become hyperinsulinemic (Fig. 2G) but are protected from severe insulin resistance as shown by the hyperinsulinemic-euglycemic clamp (Fig. 2H) and by their preserved capacity to activate hepatic Akt signal transduction following an insulin stimulus (Fig. 2I). Importantly, Balb-c mice that were fed the HFD present only a moderate increase in blood leptin levels (Fig. 2J) and are protected from diet-induced hypothalamic leptin resistance (Fig. 2K-2L). In contrast to other experimental models of obesity (4; 5; 10), Balb-c mice present no increase in the expression of hypothalamic $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 3A) and only a mild and transient increase in the expression of hypothalamic $\text{IL1}\beta$ (Fig. 3B). While obesity-prone Swiss mice present an early (one day) activation of several markers of inflammation in the hypothalamus, which include two chemokines, MCP1 and fractalkine (Fig. 3C-3J), Balb-c mice present a delayed activation of only some of these markers, which are MCP1 (Fig. 3C) and its receptor, CCR2 (Fig. 3D), CD11b (Fig. 3G), CD36 (Fig. 3H) and CD163 (Fig. 3J). Importantly, Balb-c mice present no activation of the expression of fractalkine (Fig. 3E) or its receptor, CX3CR1 (Fig. 3F). Because fractalkine is an important chemokine that is involved in neural inflammation (18; 19) we decided to focus on its

potential role in the induction of diet-induced hypothalamic inflammation in obesity and as a factor involved in the recruitment of bone-marrow derived monocytic cells to the hypothalamus.

Fractalkine is expressed in hypothalamic neurons and is induced by palmitate and TNF α . Obesity-prone Swiss mice that were fed for four weeks on a HFD exhibit the preferential expression of fractalkine in neurons of the hypothalamus (Fig. 4A-4C). In addition, both palmitate and TNF α induce a dose- and time-dependent increase in fractalkine in a hypothalamic neuronal cell-line (Fig. 4D, 4H and 4J-4K). This increase in fractalkine is accompanied by the increased expression of MCP1 (Fig. 4E and 4I). Remarkably, whereas TNF α is capable of inducing the expression of IL1 β but not of TLR4, palmitate produces an increase in TLR4 but not in IL1 β (Fig. 4F-4G). Finally, immunofluorescence staining reveals that palmitate produces changes not only in the expression of fractalkine but also in the morphology of the cells and in the distribution of AgRP granules, which become more concentrated in the perinuclear area (Fig. 4J-4K). In contrast to neurons, a monocyte-macrophage cell line does not express fractalkine even following a stimulus with palmitate (Fig. 4L). CX3CR1, the fractalkine receptor, is expressed by the monocyte-macrophage cell line but undergoes no change following palmitate stimulus (Fig. 4L). Conversely, both TLR4 and TNF α are induced in response to palmitate in the same monocyte-macrophage cell line (Fig. 4M-4N).

TNFR1 is required for the diet-induced expression of fractalkine in the hypothalamus. Because fractalkine is expressed only in neurons that are not responsive to fatty acids and that do not mount an inflammatory response (16), we hypothesized that cytokines, particularly TNF α , which is produced by microglia in response to fatty acids, would mediate the spreading of inflammation from cells of the innate immune system toward the neurons. To test this hypothesis, TNFR1 knockout mice were fed for 8 weeks on a HFD, and inflammatory markers were evaluated in the hypothalamus. As previously reported (29), TNFR1 knockout mice are protected from diet-induced obesity (Fig. 5A). Although hypothalamic TNF α is increased in mice that are fed the HFD (Fig. 5B),

this increase was accompanied by no changes in the expression of other markers of inflammation, such as IL6 (Fig. 5C), IL1 β (Fig. 5D) and IL10 (Fig. 5E); additionally, no changes in the expression of either fractalkine (Fig. 5F) or its receptor were observed (Fig. 5G). Conversely, when IL10 knockout mice were fed a HFD for eight weeks, body mass increased significantly (Fig. 5H), and the expression of inflammatory cytokines (Fig. 5I-5K) and fractalkine (Fig. 5L) and its receptor were stimulated (Fig. 5M).

The inhibition of hypothalamic fractalkine reduces diet-induced hypothalamic inflammation and corrects glucose intolerance. Using a siRNA approach, we obtained up to a 70% reduction in the expression of fractalkine in the AgRP-expressing mHypoA 2/29 CLU189 neuron cell-line (Fig. 6A). A protocol was conducted according to Figure 6B; thus, a single dose of the siRNA was injected on the same day that the HFD was introduced; some mice were employed in experiments after two days, while the remaining mice were monitored for two weeks before additional experiments were performed. The inhibition of hypothalamic fractalkine resulted in the reduction of the diet-induced activation of several inflammatory markers in the hypothalamus of Swiss mice that were fed the HFD for two days (Fig. 6C-6N). After two weeks, the inhibition of hypothalamic fractalkine (Fig. 6O) was insufficient to produce significant changes in body mass (Fig. 6P-6Q); however, a glucose tolerance test (Fig. 6R) and an insulin tolerance test (Fig. 6S) revealed a beneficial effect of inhibiting hypothalamic fractalkine, which was confirmed by a reduction in the glucose area under the curve (Fig. 6R) and in the constant for glucose decay (kITT) (Fig. 6S).

The inhibition of fractalkine reduces the diet-induced activation of inflammatory cells in the hypothalamus. Employing a protocol similar to the one depicted in Figure 6B, we inhibited the expression of fractalkine in the hypothalamus of wild-type mice that were previously submitted to a bone marrow transplant from GFP (Fig. 7A and 7B). Two weeks after the intracerebroventricular injection of the siRNA and the introduction of the HFD, the number of cells that expressed fractalkine was greatly reduced, and there were virtually no GFP-expressing cells

in the arcuate nucleus (Fig. 7A) compared with the controls that were treated with the scrambled RNA. Moreover, there were few Iba1-expressing cells in the hypothalamus of siRNA treated mice (Fig. 7B). In additional experiments, Swiss mice were treated with siRNA against fractalkine, and after two weeks on the HFD, the phenotype of the microglia/macrophage population in the hypothalamus was evaluated by flow cytometry. As depicted in Figure 7C, the inhibition of fractalkine resulted in an increased number of cells that expressed the anti-inflammatory marker CD206.

The inhibition of hypothalamic fractalkine reduces diet-induced body mass gain and adiposity. In the 2-week protocol, as depicted in Figure 6B, no significant change in body mass was detected; however, a trend, as shown in Figure 6P, prompted us to extend the protocol. Therefore, we repeated the intracerebroventricular treatments with either siRNA against fractalkine or its scrambled control and monitored the mice for 6 weeks (Fig. 8A). The extended time resulted in significant changes in body mass (Fig. 8B-8D) and adiposity (Fig. 8E) without any significant modification in caloric intake (Fig. 8F).

Discussion

Body mass stability is defended by a complex and integrated neuronal circuitry that controls caloric intake and energy expenditure (30). Neurons of the hypothalamus are an important part of this circuitry because they are capable of sensing the signals that reflect the amount of energy that is stored in the body and of integrating this information with effector neurons of other brain regions (1). For most people, and for experimental animals, changes in the defended set point of adiposity are rapidly followed by adaptations that gradually lead to a return to the original body mass (31-33). However, environmental and genetic factors can act in concert to disrupt this stability (1; 8; 30; 34). The increased consumption of dietary fats is an important environmental factor that contributes to the rise of obesity in the world (35). Dietary fats, particularly long-chain saturated fatty

acids, can trigger hypothalamic inflammation through the activation of TLR4 signaling and through the induction of endoplasmic reticulum stress (4-7; 36). Prolonged exposure to this inflamed milieu results in the loss of neurons and in the impaired capacity of neuronal regeneration (12; 13). Therefore, it is currently accepted that hypothalamic dysfunction that results from prolonged inflammation is an important mechanism that leads to obesity (8; 30).

A recent study has shown that hypothalamic inflammation is rapidly induced after the introduction of a fat-rich diet (10). However, upon continuous and prolonged exposure to dietary fats, the expression of inflammatory markers undergoes oscillation, fading away during the second and third weeks, and returning and remaining elevated thereafter (10). This oscillatory pattern of inflammatory activity has been described in other contexts and is the result of a balance between pro- and anti-inflammatory factors that are allied to the recruitment of new cells to the affected anatomical site (37; 38). In the present study, we initially asked whether bone marrow-derived cells would be recruited to the hypothalamus during the induction of diet-induced obesity. To test this hypothesis, we took advantage of the paradigm that a functional TLR4 is necessary for the complete induction of diet-induced hypothalamic inflammation (5). Using bone marrow transplantation, we produced chimeras that expressed functional TLR4 only in bone marrow-derived cells or only in non-bone marrow-derived cells. In addition, we produced chimeras expressing GFP only in bone marrow-derived cells. Taken together, the results of these experiments showed that bone marrow-derived cells with a functional TLR4 are important for the full induction of diet-induced hypothalamic inflammation and the obese phenotype.

In other inflammatory conditions of the central nervous system, the recruitment of bone marrow-derived cells is known to play important roles in the progression of these diseases. For instance, in experimental Parkinson's disease, bone marrow-derived microglia can express the inducible form of nitric oxide synthase, which is an important effector of neurodegenerative damage (39). However, cells that migrate from the bone marrow do

not only deliver damaging effects; a recent study has shown that, in another model of experimental Parkinson's disease, bone marrow-derived cells can act protectively by delivering neurotrophic factors to the site of injury (40).

Alzheimer's disease is yet another neurodegenerative condition that is associated with inflammation (41; 42). Interestingly, epidemiological studies indicate an increased risk for the development of Alzheimer's disease in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus (43), and a recent study has provided a molecular basis for this association showing that amyloid β peptide ($A\beta$) oligomers can activate $TNF\alpha$ /JNK signaling, which leads to the inhibitory Ser-phosphorylation of brain IRS1 (44). As in Parkinson's, Alzheimer's disease is characterized by the recruitment of bone marrow-derived microglia that can exert both pro- and anti-inflammatory roles (38; 42).

In the second part of this study, we evaluated the potential role of fractalkine as a chemokine that is involved in the recruitment of bone marrow-derived cells to the hypothalamus during the induction of diet-induced obesity. Fractalkine is a unique chemokine because it is initially synthesized as a transmembrane protein, which is released as a soluble chemoattractant protein following the enzymatic cleavage by metalloproteinases (45; 46). Fractalkine signals through the CX3CR1 selective receptor to recruit bone marrow-derived cells to the site of inflammation (47). In this study, fractalkine was chosen because it is expressed in neurons (48) and is involved in the modulation of inflammatory activity in distinct neurological conditions (49; 50).

Initially in working with mouse strains with different predispositions to obesity, we demonstrated that upon high-fat feeding, fractalkine was the inflammatory marker with the most remarkable difference between the strains. In fact, even after prolonged exposure to dietary fats, Balb-c mice, which are resistant to diet-induced obesity and diabetes, did not present an increased expression of this chemokine in the hypothalamus. In the obese-prone Swiss mouse, the introduction of dietary fat was rapidly followed by an increase in the expression of fractalkine in hypothalamic neurons. No stimulus for fractalkine expression was detected in other brain

regions (not shown), which is in accordance with previous reports that showed the anatomical selectivity of the brain inflammatory process in obesity (4; 5; 10; 12). Both in living animals and in cell culture experiments, the expression of fractalkine was limited to neurons, whereas microglia and the monocyte cell-line express only the fractalkine receptor. In the cell culture experiments, the combination of results that were obtained when the cells were treated with palmitate or TNF α suggests that monocytes are more responsive to palmitate expressing TNF α , whereas the neuron cell-line is more responsive to TNF α producing fractalkine and other inflammatory markers. This observation is in accordance with a previous study (16) and suggests that neurons are not the primary targets for dietary fats, which are affected only after glial cells are engaged, as previously proposed (10; 30).

Next, we designed a siRNA to inhibit the expression of fractalkine. In the obesity-prone Swiss mouse, the inhibition of hypothalamic fractalkine resulted in the reduction of the inflammatory activity and in the recruitment of bone marrow-derived cells to the hypothalamus. These effects were accompanied by a reduction of adiposity and a reduction of glucose intolerance. In several studies that explored the inflammatory mechanisms that lead to an anomalous function of the hypothalamus in obesity, the pharmacological and/or genetic inhibition of distinct components of the inflammatory machinery resulted in the reduction of the obese phenotype. This result was obtained by targeting proteins that are involved in intracellular signaling, such as JNK (4), IKK (6) and PKC- θ (11); a protein that is involved in the regulation of the inflammatory signal, SOCS3 (51); membrane receptors, such as TLR4 (5) and TNFR1 (29); endoplasmic reticulum stress (5-7); and at least one cytokine, TNF α (52). Now, we provide the first evidence for the role of a chemokine in this process. Within the multistep progression of most types of inflammatory responses, the recruitment of bone marrow-derived cells to the site of damage is an important event that warrants the equilibrium between effector and regulatory activities (53; 54). The initial descriptions of fractalkine actions in inflammatory conditions of the brain suggested

that it predominantly exerted an anti-inflammatory activity (55; 56). However, subsequent studies provided evidence for its role in the recruitment of pro-inflammatory cells as well (57; 58). Here, in the diet-induced inflammatory process of the hypothalamus, fractalkine is also involved in the induction of the inflammatory activity.

Two lines of evidence support the pro-inflammatory role of fractalkine in the hypothalamus of obese mice. First, in the context of cytokine expression, the inhibition of fractalkine resulted in the reduction of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$. This observation is in line with previous studies that showed an important role for both of these pro-inflammatory cytokines in diet-induced hypothalamic inflammation (4; 6; 29). Second, in the context of cell infiltration, a reduction in the expression of fractalkine led to an inhibition of the migration of bone marrow-derived cells towards the hypothalamus and to an increased relative presence of monocytic cells of an anti-inflammatory phenotype, which expressed CD206. In other inflammatory conditions of the brain, an increased presence of CD206 cells was related to the reduction of local inflammatory activity (59).

A recent study has shown that even in mice that are not fed a HFD, bone marrow-derived cells can modulate food intake and energy expenditure by delivering BDNF to the hypothalamus (60). The defective expression of BDNF in hematopoietic cells resulted in obesity, which was corrected by wild-type bone marrow transplantation. This observation raises the intriguing question of whether the hypothalamus, as a sensor for peripheral signals that indicate the variations in whole body energy stores, is continuously monitored by bone marrow-derived immune cells. If that scenario is indeed the case, it may explain why there is such an anatomical specificity in brain inflammation in obesity. We propose that fractalkine is one of the earliest regulators of this process by controlling the homing of pro- and anti-inflammatory macrophages (bone marrow-derived cells that express CD206) to the hypothalamus. In this model, resident microglia are rapidly activated recruited in response to dietary fats by producing signals that induce the expression of fractalkine by neurons. If the exposure to fats is

rapidly interrupted, then the first wave of inflammation can be self-contained (10); however, upon the persistence of the dietary-stimulus, a permanent wave of inflammation is warranted by the recruitment of bone marrow-derived cells.

In summary, this study shows that bone marrow-derived cells are important for the progression of the inflammatory process in the hypothalamus in diet-induced obesity and that fractalkine plays an important role in this process.

Acknowledgements. We thank Dr E. Roman, Mr. J. G. Ferraz and Mr. M. Cruz, from the University of Campinas, for technical assistance. The support for the study was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The laboratories of Cell Signaling and Experimental Endocrinology belong to the Obesity and Comorbidities Research Center and National Institute of Science and Technology – Diabetes and Obesity.

References

1. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289-295
2. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H: Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 2008;70:537-556
3. Ryan KK, Woods SC, Seeley RJ: Central nervous system mechanisms linking the consumption of palatable high-fat diets to the defense of greater adiposity. *Cell Metab* 2012;15:137-149
4. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA: Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192-4199
5. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carnevali JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA: Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009;29:359-370
6. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D: Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008;135:61-73
7. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr., Ozcan U: Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35-51
8. Velloso LA, Schwartz MW: Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:1455-1465
9. van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, Chaim EA, Pareja JC, Geloneze B, Li LM, Cendes F, Velloso LA: Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes* 2011;60:1699-1704
10. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW: Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012;122:153-162
11. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre AL, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, Niswender K, Irani BG, Holland WL, Clegg DJ: Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 2009;119:2577-2589
12. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevali JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA: High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 2009;4:e5045
13. Li J, Tang Y, Cai D: IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* 2012;14:999-1012
14. Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;34:637-650
15. Hotamisligil GS: Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900-917

16. Choi SJ, Kim F, Schwartz MW, Wisse BE: Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E1122-1130
17. Schwartz M, Shechter R: Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010;6:405-410
18. Cardona AE, Li M, Liu L, Savarin C, Ransohoff RM: Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol* 2008;84:587-594
19. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM: Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 2006;9:917-924
20. Eide L, McMurray CT: Culture of adult mouse neurons. *Biotechniques* 2005;38:99-104
21. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I: Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978;15:261-267
22. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S: Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 2006;49:489-502
23. Pereira TC, Bittencourt V.D., Secolin R., Rocha C.S., Maya I.G., Lopes-Cendes I.: Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genetics and Molecular Biology* 2007;30:1206-1208
24. Kinote A, Faria JA, Roman EA, Solon C, Razolli DS, Ignacio-Souza LM, Sollon CS, Nascimento LF, de Araujo TM, Barbosa AP, Lellis-Santos C, Velloso LA, Bordin S, Anhe GF: Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology* 2012;153:3633-3645
25. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ: Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005;146:1576-1587
26. Camacho A, Rodriguez-Cuenca S, Blount M, Prieur X, Barbarroja N, Fuller M, Hardingham GE, Vidal-Puig A: Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Exp Neurol* 2012;237:396-406
27. Lundbaek K: Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 1962;1:1507-1513
28. Chakravarty S, Herkenham M: Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* 2005;25:1788-1796
29. Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperis GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA: Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 2009;284:36213-36222
30. Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, Wisse BE, Schwartz MW: Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes* 2013;62:2629-2634

31. Rosenbaum M, Kissileff HR, Mayer LE, Hirsch J, Leibel RL: Energy intake in weight-reduced humans. *Brain Res* 2010;1350:95-102
32. Sims EA, Goldman RF, Gluck CM, Horton ES, Kelleher PC, Rowe DW: Experimental obesity in man. *Trans Assoc Am Physicians* 1968;81:153-170
33. Zhao ZJ, Chi QS, Cao J, Han YD: The energy budget, thermogenic capacity and behavior in Swiss mice exposed to a consecutive decrease in temperatures. *J Exp Biol* 2010;213:3988-3997
34. Ramachandrappa S, Farooqi IS: Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest* 2011;121:2080-2086
35. Cascio G, Schiera G, Di Liegro I: Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev* 2012;8:2-17
36. Coope A, Milanski M, Arruda AP, Ignacio-Souza LM, Saad MJ, Anhe GF, Velloso LA: Chaperone insufficiency links TLR4 protein signaling to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2012;287:15580-15589
37. Hickman SE, El Khoury J: Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010;9:168-173
38. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML: Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 2013;339:156-161
39. Kokovay E, Cunningham LA: Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005;19:471-478
40. Biju KC, Santacruz RA, Chen C, Zhou Q, Yao J, Rohrabough SL, Clark RA, Roberts JL, Phillips KA, Imam SZ, Li S: Bone marrow-derived microglia-based neurturin delivery protects against dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2013;535:24-29
41. Krstic D, Knuesel I: Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2013;9:25-34
42. Rivest S: Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 2009;9:429-439
43. Craft S: Alzheimer disease: Insulin resistance and AD--extending the translational path. *Nat Rev Neurol* 2012;8:360-362
44. Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, Silverman MA, Kazi H, Melo HM, McClean PL, Holscher C, Arnold SE, Talbot K, Klein WL, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG: An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated Abeta oligomers. *J Clin Invest* 2012;122:1339-1353
45. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T: Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:34-40
46. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW: Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 2001;276:37993-38001
47. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O: Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-530

48. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L: Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10896-10901
49. Cho SH, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L: CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2011;286:32713-32722
50. Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Kim HM, Leverenz JB, Montine TJ, Ginhina C, Kang UJ, Cain KC, Wang Y, Aasly J, Goldstein D, Zhang J: Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol* 2011;69:570-580
51. Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, Lee CE, Elmquist JK, Yoshimura A, Flier JS: Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab* 2006;4:123-132
52. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, Romanatto T, Pascoal LB, Caricilli AM, Torsoni MA, Prada PO, Saad MJ, Velloso LA: Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 2012;61:1455-1462
53. Ziegler-Heitbrock L: The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;81:584-592
54. Mizuno T: The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012;2012:737846
55. Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C, Taupin V: Fractalkine modulates TNF- α secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 2000;29:305-315
56. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ: Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8075-8080
57. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM: The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 2006;20:896-905
58. Denes A, Ferenczi S, Halasz J, Kornyei Z, Kovacs KJ: Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1707-1721
59. Hjorth E, Zhu M, Toro VC, Vedin I, Palmblad J, Cederholm T, Freund-Levi Y, Faxen-Irving G, Wahlund LO, Basun H, Eriksdotter M, Schultzberg M: Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid-beta₄₂ by human microglia and decrease inflammatory markers. *J Alzheimers Dis* 2013;35:697-713
60. Urabe H, Kojima H, Chan L, Terashima T, Ogawa N, Katagi M, Fujino K, Kumagai A, Kawai H, Asakawa A, Inui A, Yasuda H, Eguchi Y, Oka K, Maegawa H, Kashiwagi A, Kimura H: Haematopoietic cells produce BDNF and regulate appetite upon migration to the hypothalamus. *Nat Commun* 2013;4:1526

Table

Table 1. Macronutrient composition of diets

	Chow Diet ¹	High Fat Diet
Net protein (g %)	22,5	26,0
Ether Extract (Fat content) (g %)	4,5	35,0
Carbohydrates (g %)	55,0	26,0
Fibrous matter (g %)	8,0	6,0
Ash matter (g %)	10,0	7,0
Total	100,0	100,0
Kcal/g	3,5	5,2

¹ (NUVILAB® Cr-1, Nuvital, PR - Brasil)

Figure Legends

Figure 1. A, Protocols that were employed to generate the chimeras and controls; male C3H/HeJ or C3H/HePas mice were submitted to a whole body 8 Gy irradiation (WB8Gy) at 4 weeks of age and then immediately received a bone marrow transplantation (TxT/BM) from either GFP, C3H/HePas or C3H/HeJ donors; after a 2 week resting period (RP), mice were tested for transplant efficiency and thereafter were used in the experiments. B, Transplant efficiency was tested by monitoring the expression of the wild-type and mutated forms of the TLR4 gene by BstO1 digestion of the reverse-transcription PCR amplified products; products were separated by electrophoresis in agarose gel; wild-type cDNA resulted in a fragment of 267 bp, whereas mutated cDNA resulted in a fragment of 294 bp. C, Cd11c indirect immunofluorescence staining of paraformaldehyde fixed, paraffin embedded, 5.0 μ m hypothalamic sections (at approximately Bregma -1.7) that were obtained from C3H/HeJ and C3H/HePas that were fed a HFD for four weeks; nuclei were counterstained with DAPI. D, the detection of GFP-expressing cells in paraformaldehyde fixed, paraffin embedded, 5.0 μ m hypothalamic sections (at approximately Bregma -1.7) that were obtained from C3H/HeJ that were transplanted with bone marrow from a whole-body GFP-expressing transgenic mouse. E-H, mice that were submitted to the transplantation protocols, as depicted in A, were fed regular chow (CT) or a high-fat diet (HF) for four weeks and were evaluated for total body mass change (E), body mass change relative to the control (F), and visceral fat pad (G-H). In all experiments, n = 6; in E, *p<0.05 compared with the respective CT; in F, *p<0.05 compared with C3H/HePas, #p<0.05 compared with C3H/HeJ; in H, *p<0.05 compared with the respective CT, #p<0.05 compared with C3H/HePas HF, §p<0.05 compared with C3H/HeJ HF. Abbreviations: TDNH/I/GFPEH, TLR4 deficient in non-hematopoietic tissue/TLR4-expressing hematopoietic tissue/GFP-expressing hematopoietic tissue; TDITEH, TLR4-deficient non-hematopoietic tissue/TLR4-expressing hematopoietic tissue; TENH/TDH, TLR4-expressing hematopoietic tissue/TLR4-deficient non-hematopoietic tissue/GFP-expressing hematopoietic tissue.

Figure 2. Six-week-old, male, Balb-c (Bb) or Swiss (Sw) mice were randomly selected for groups that were fed chow or a high-fat diet (HFD) for 8 weeks. Body mass was determined weekly (A). Body mass change was calculated at the end of the experimental period (B). Mean caloric intake was calculated at the end of 2, 4 and 8 weeks (C). Oxygen consumption (D), carbon dioxide production (E) and respiratory quotient (RQ) (F) were determined in a calorimeter during the eighth week of the experimental protocol. Serum insulin (G) and glucose consumption during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp (H) were determined during the eighth week of the experimental protocol. Insulin-induced Ser473-phosphorylation of Akt was determined using an immunoblot of total liver protein extracts that were obtained from mice that were treated with a single intravenous (portal vein) bolus injection of saline (-) or insulin (+) (I). Serum leptin levels (J) and caloric intake following leptin (Lep) or saline (Sal) intraperitoneal injection (K-L) were determined during the eighth week of the experimental protocol. In all experiments, n=6. In all panels, *p<0.05 for Swiss that were fed a HFD compared with Balb-c that were fed a HFD; #p<0.05 compared with respective control that were fed chow.

Figure 3. Six-week-old, male, Balb-c (Bb) or Swiss (Sw) mice were fed a high-fat diet (HFD) for 1 day-8 weeks, as depicted in the panels. At the end of the respective experimental periods, hypothalami were obtained for RNA extraction. The cDNA that was produced from total RNA was employed in real-time PCR assays to determine the expression of TNF α (A), IL1 β (B), MCP1 (C), CCR2 (D), fractalkine (CX3CL1) (E), fractalkine receptor (CX3CR1) (F), CD11b (G), CD36 (H), MRC1 (I) and CD163 (J). The results are expressed as the fold change compared with the level of respective gene expression in the hypothalamus of lean (chow-fed), strain-specific controls. In all experiments, n=6; #p<0.05 compared with the respective lean control.

Figure 4. Six-week-old, male, Swiss mice were fed a HFD for 4 weeks and then were used in the following experiments: fractalkine compared with CD11b (A); fractalkine compared with F4/80 (B) and fractalkine compared with AgRP (C) indirect immunofluorescence staining of paraformaldehyde fixed, paraffin embedded,

5.0 μm hypothalamic sections (at approximately Bregma -1.7). In D-G, the AgRP-expressing mHypoA 2/29 CLU189 neuron cell-line was treated for 4 h with the concentrations of palmitate or $\text{TNF}\alpha$, as depicted in the panels; at the end of the experimental periods, cells were harvested, RNA extracted and the resulting cDNA was employed in real-time PCR experiments to determine the expression of fractalkine (CX3CL1) (D), MCP-1 (E), $\text{IL1}\beta$ (F) and TLR4 (G). In H-I, the AgRP-expressing mHypoA 2/29 CLU189 neuron cell-line was exposed to 270 μM palmitate or 50 nM $\text{TNF}\alpha$ for the time depicted in the panels; at the end of the experimental periods, cells were harvested, RNA was extracted and the resulting cDNA was employed in real-time PCR experiments to determine the expression of fractalkine (CX3CL1) (H) and MCP-1 (I). The expression and distribution of fractalkine and AgRP in steady-state (Control) (J) or palmitate (270 μM for 4 h) (K) treated mHypoA 2/29 CLU189 cells were determined by indirect immunofluorescence staining. In L, the monocyte cell-line RAW 264.7 was treated for 4 h with 270 μM palmitate or vehicle; at the end of the experimental period, cells were harvested, RNA was extracted and the resulting cDNA was employed in real-time PCR experiments to determine the expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor (CX3CR1). In M-N, RAW 264.7 cells were treated with 270 μM palmitate for 2-6 h, as depicted in the panels; cells were harvested, RNA was extracted and the resulting cDNA was employed in real-time PCR experiments to determine the expression of TLR4 (M) and $\text{TNF}\alpha$ (N). The results in the real-time experiments are expressed as the fold change compared with the level of respective gene expression in vehicle-treated cells. In all experiments, $n=6$; $\#p<0.05$ compared with vehicle treated cells.

Figure 5. Six-week old male $\text{TNFRp55}^{-/-}$ (TNFR1-KO) (A-G), $\text{IL10}^{-/-}$ (IL10-KO) (H-M) and the respective controls C57BL/6J mice were randomly assigned to either chow or high-fat diet (HFD) for 8 weeks. Body mass was determined every second week (A and H). At the end of the experimental period, hypothalami were obtained for RNA extraction. The cDNA produced from total RNA was employed in real-time PCR assays to determine the expression of $\text{TNF}\alpha$ (B and I), IL6 (C and J), $\text{IL1}\beta$ (D and K), IL10 (E), fractalkine (CX3CL1) (F and L) and fractalkine

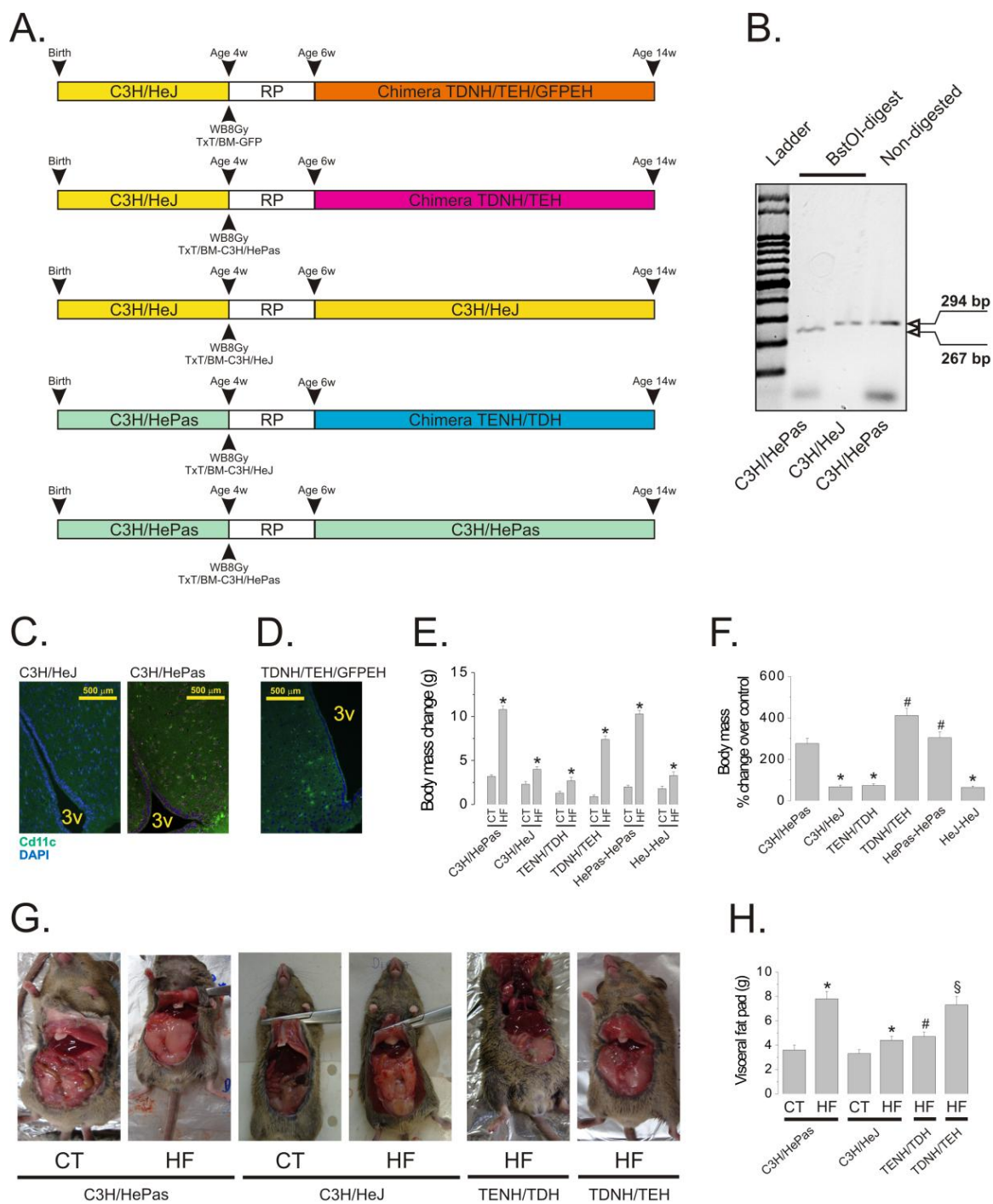
receptor (CX3CR1) (G and M). The results are expressed as the fold change compared to the level of respective gene expression in the hypothalamus of lean (chow-fed), strain-specific controls. In all experiments, n=6; #p<0.05 compared with respective lean control; *p<0.05 compared with wild-type in the same diet.

Figure 6. The AgRP-expressing mHypoA 2/29 CLU189 neuron cell-line was exposed to a small-interfering (SI) RNA that was designed to inhibit the expression of fractalkine or its respective scrambled (SC) control at the concentrations depicted in panel (A); at the end of the experimental period, cells were harvested, RNA was extracted and the resulting cDNA was employed in real-time PCR experiments to determine the expression of fractalkine (CX3CL1). In B, the protocol that was employed to treat male Swiss mice with a single intracerebroventricular dose (2.0 μ l, 25 pM) of small interfering (SI) or scrambled (SC) RNAs against fractalkine; following SI or SC injections, mice were assigned a high-fat diet (HFD). Some mice were randomly selected for evaluation of hypothalamic gene expression two days (2d) after treatment (C-N); the remaining mice were evaluated 2 weeks (2w) after treatment. In C-O, hypothalami were obtained for RNA extraction. The cDNA that was produced from total RNA was employed in real-time PCR assays to determine the expression of fractalkine (CX3CL1) (C and O), MCP1 (D), CD11b I, CD36 (F), MRC1 (G), CD163 (H), MCP3 (I), F4/80 (J), TNF α (K), IL6 (L), IL1 β (M) and IL10 (N). Body mass was determined weekly (P); body mass gain was determined at the end of the experimental period (Q). At the end of the experimental period, randomly selected mice were submitted to either a glucose tolerance test, where the area under the glucose curve was calculated, or to an insulin tolerance test (S), where the constant for glucose decay (kITT) was calculated. In real-time PCR experiments, the results are expressed as the relative gene expression. In all experiments, n=6: #p<0.05 compared with SC.

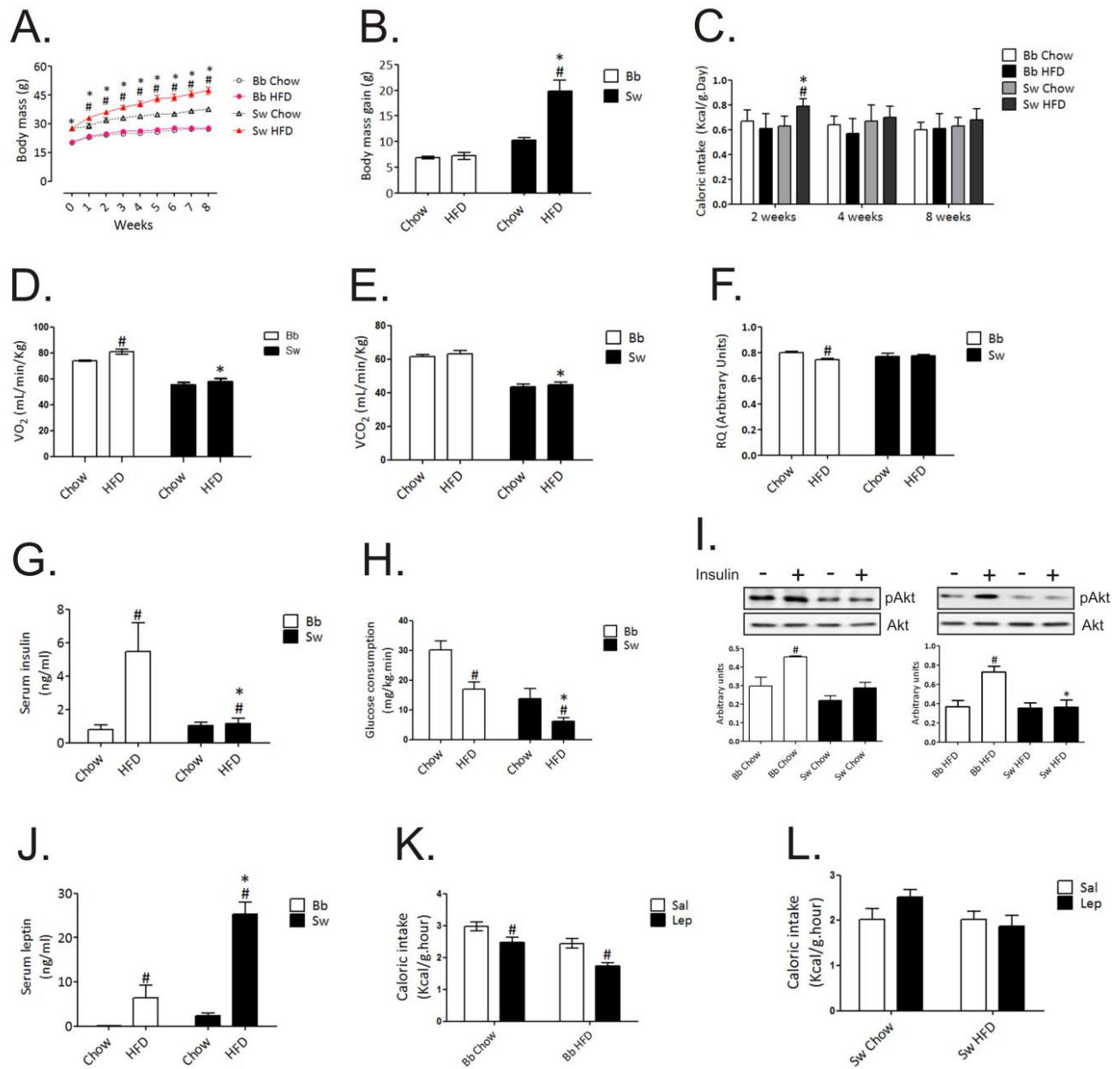
Figure 7. Male, 6-week-old Swiss mice were injected with a single intracerebroventricular dose (2.0 μ l, 25 pM) of small interfering (SI) or scrambled (SC) RNAs against fractalkine; following SI or SC injections, mice were assigned a high-fat diet (HFD). Some mice were randomly selected for the evaluation of hypothalamic gene expression

two days (2d) after treatment (C-N); the remaining mice were evaluated 2 weeks (2w) after treatment. In all experiments, n=6; #p<0.05 compared with SC.

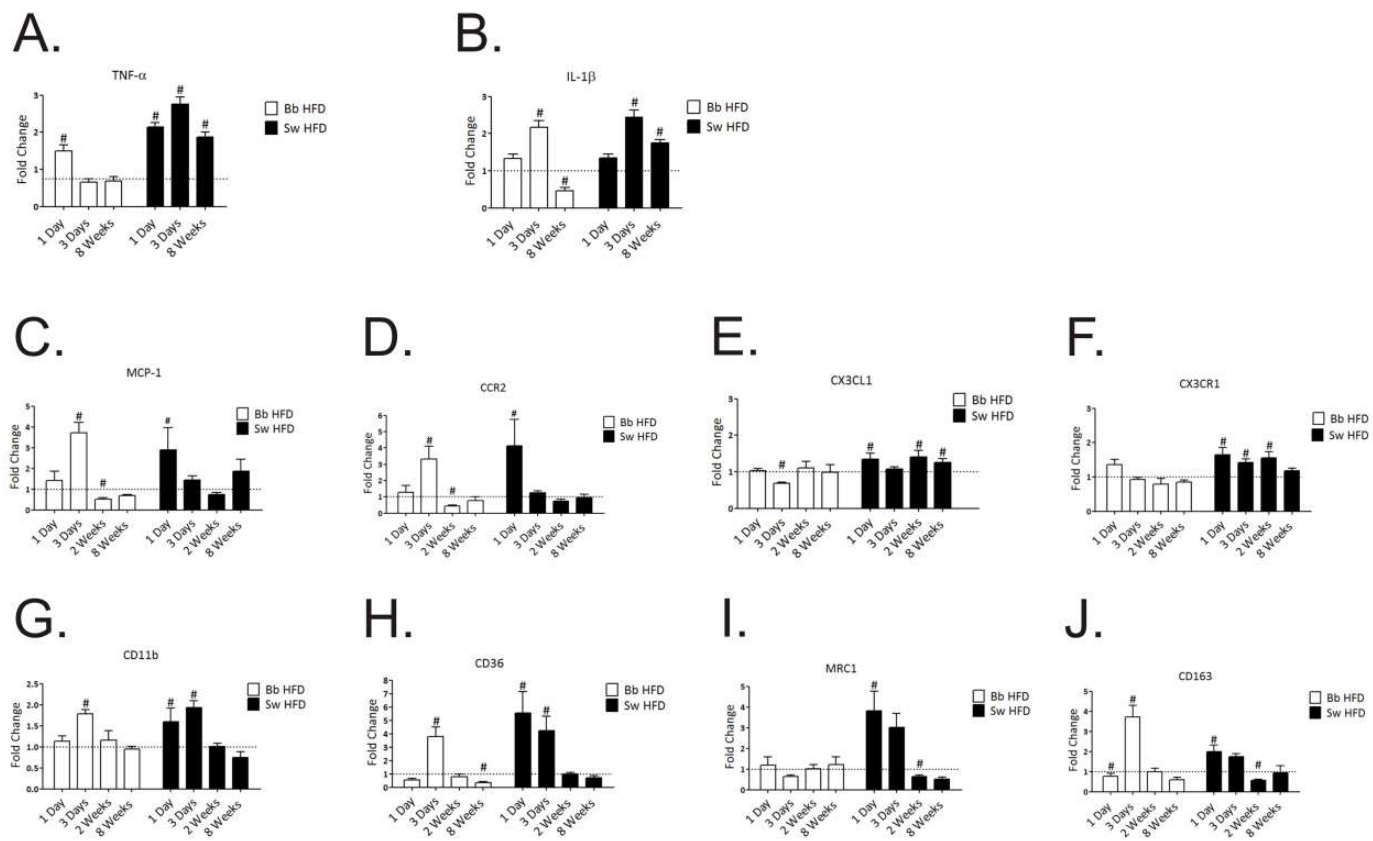
Figure 8. Male, 6-week-old Swiss mice were injected with a single intracerebroventricular dose (2.0 μ l, 25 pM) of small interfering (SI) or scrambled (SC) RNAs against fractalkine; following SI or SC injections, mice were assigned a high-fat diet (HFD) for 6 weeks (A). Visceral adiposity was determined at the end of the experimental period (B). Body mass was determined every second week (C). The variation of body mass (D) and the mass of epididymal fat (E) were determined at the end of the experimental period. The mean daily caloric intake was calculated for the entire experimental period (F). In all experiments, n = 6; *p<0.05 compared with SC.



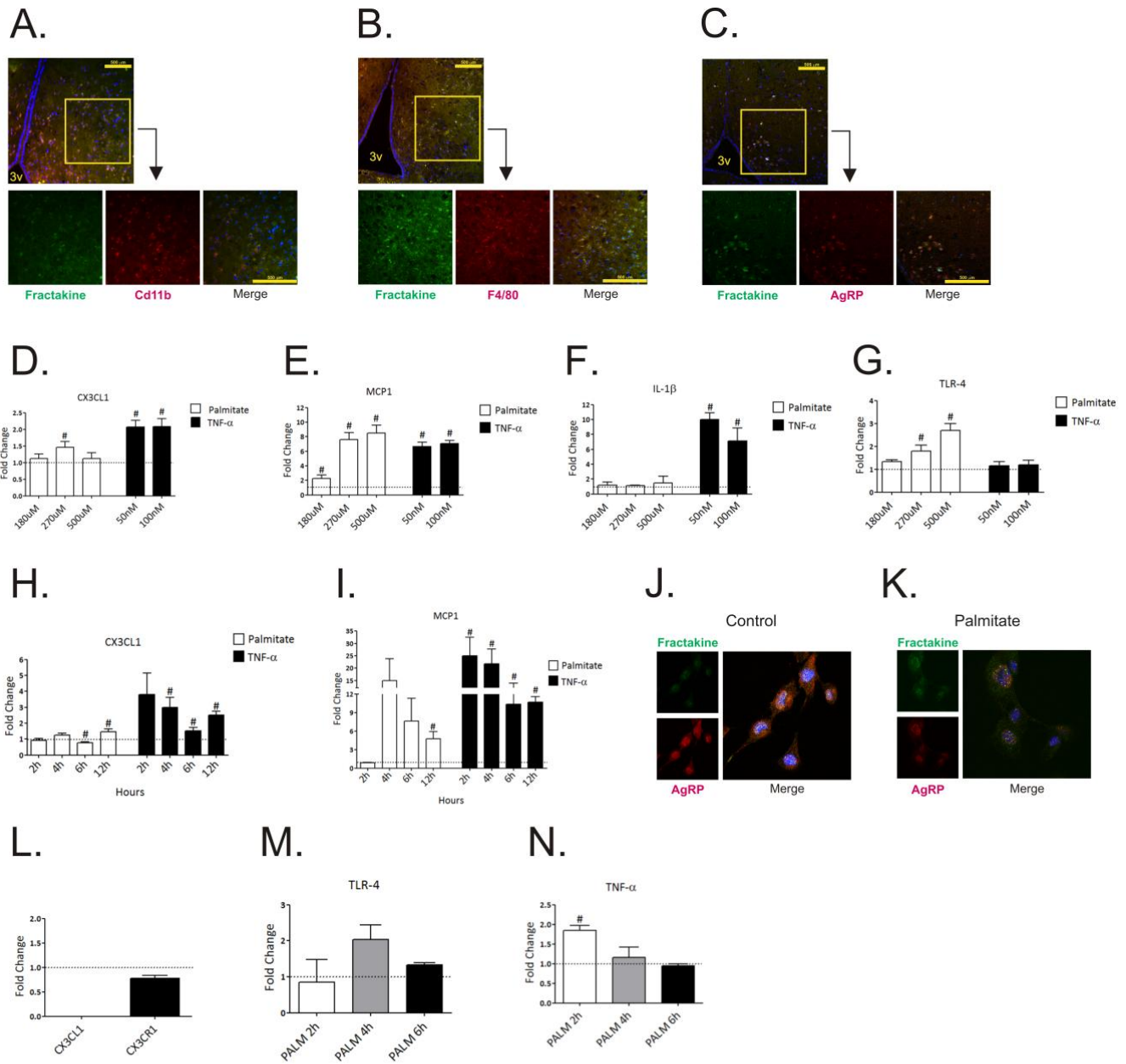
Morari, Fig 1



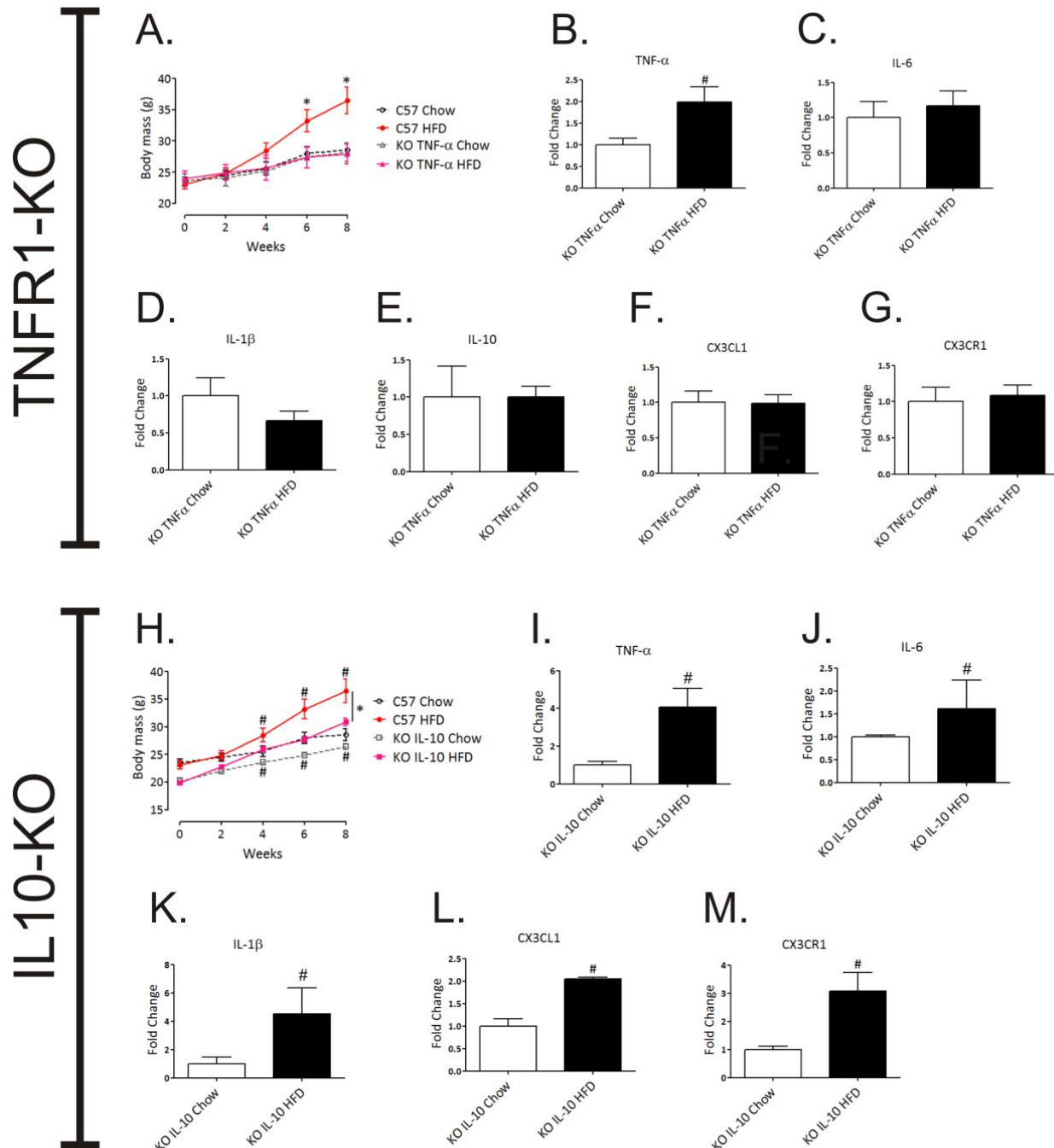
Morari, Fig 2



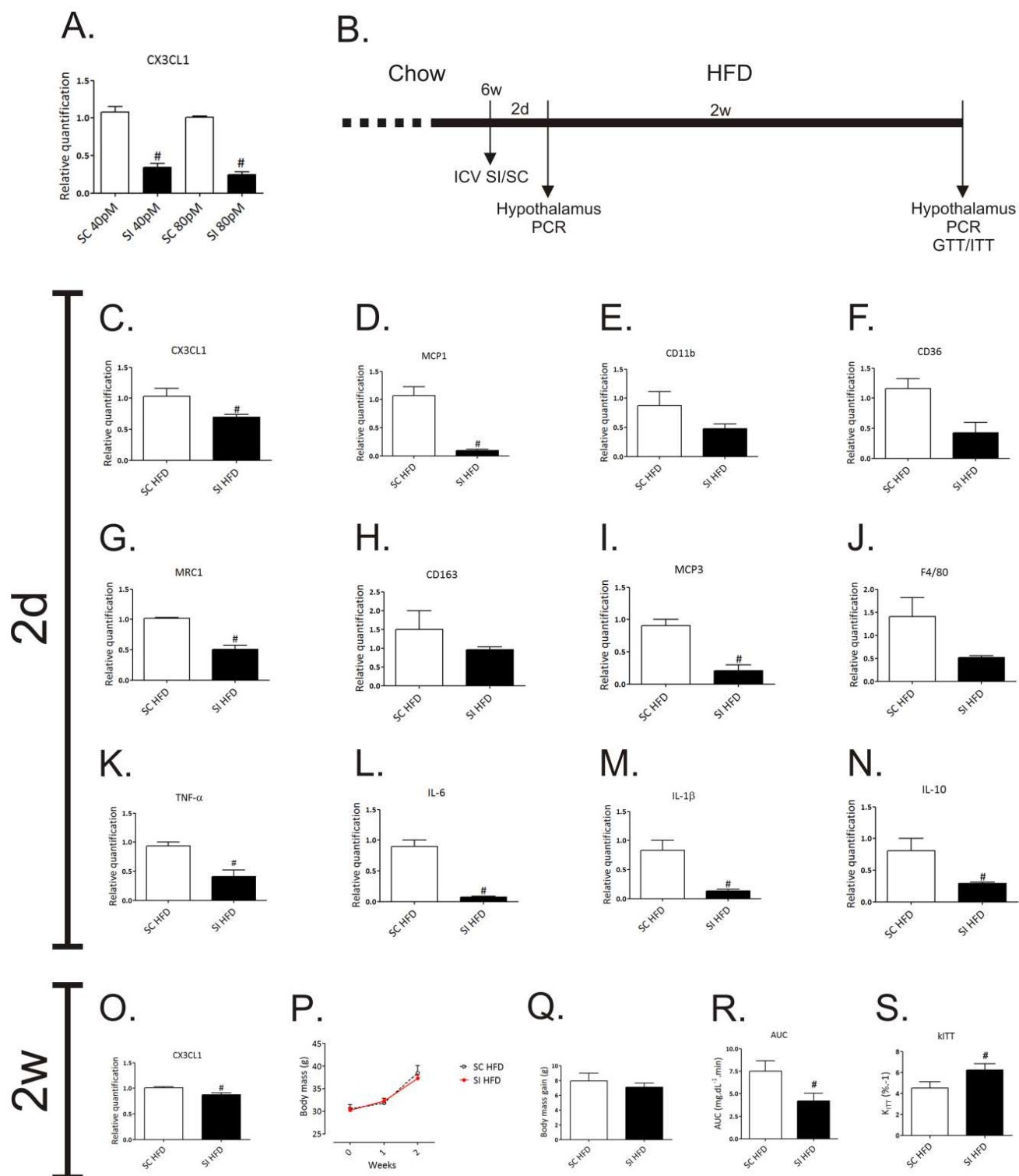
Morari, Fig 3



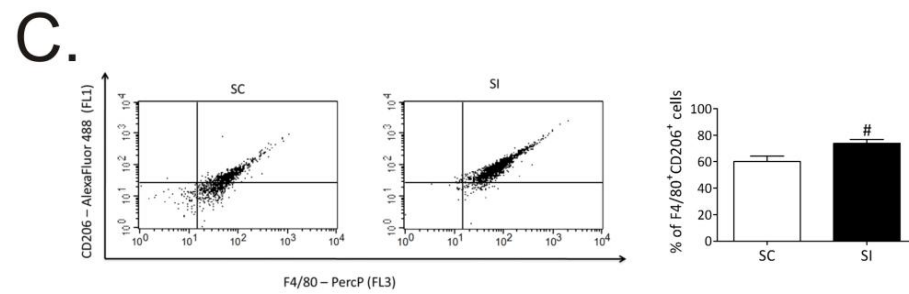
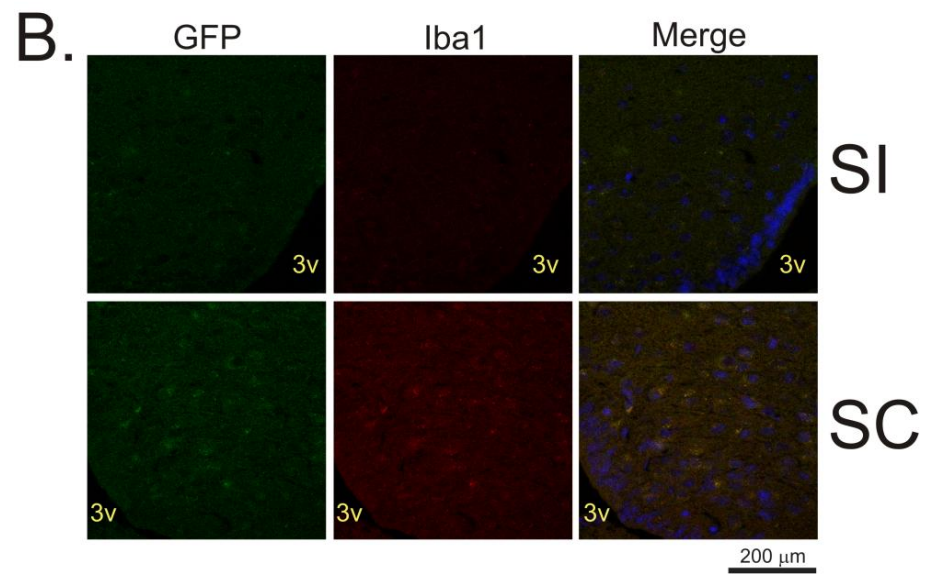
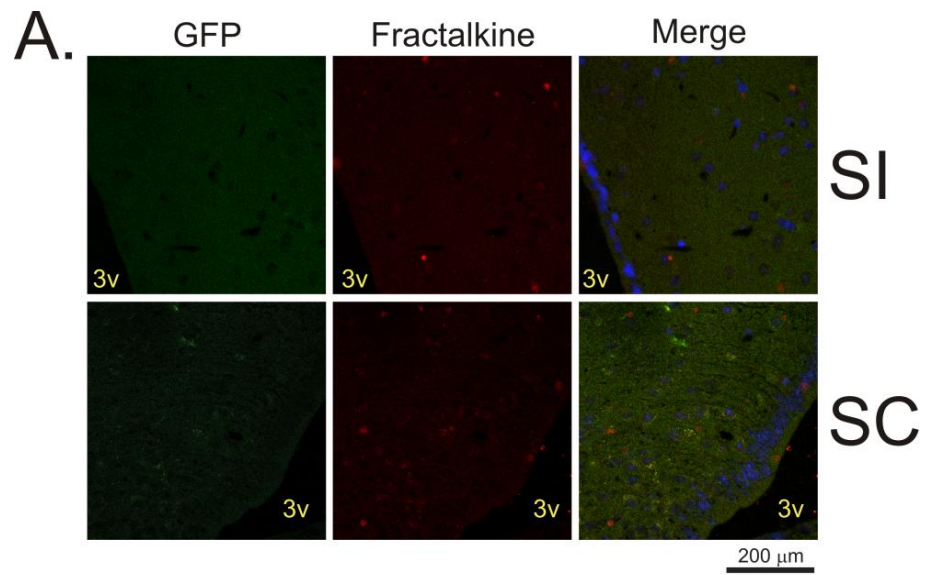
Morari, Fig 4



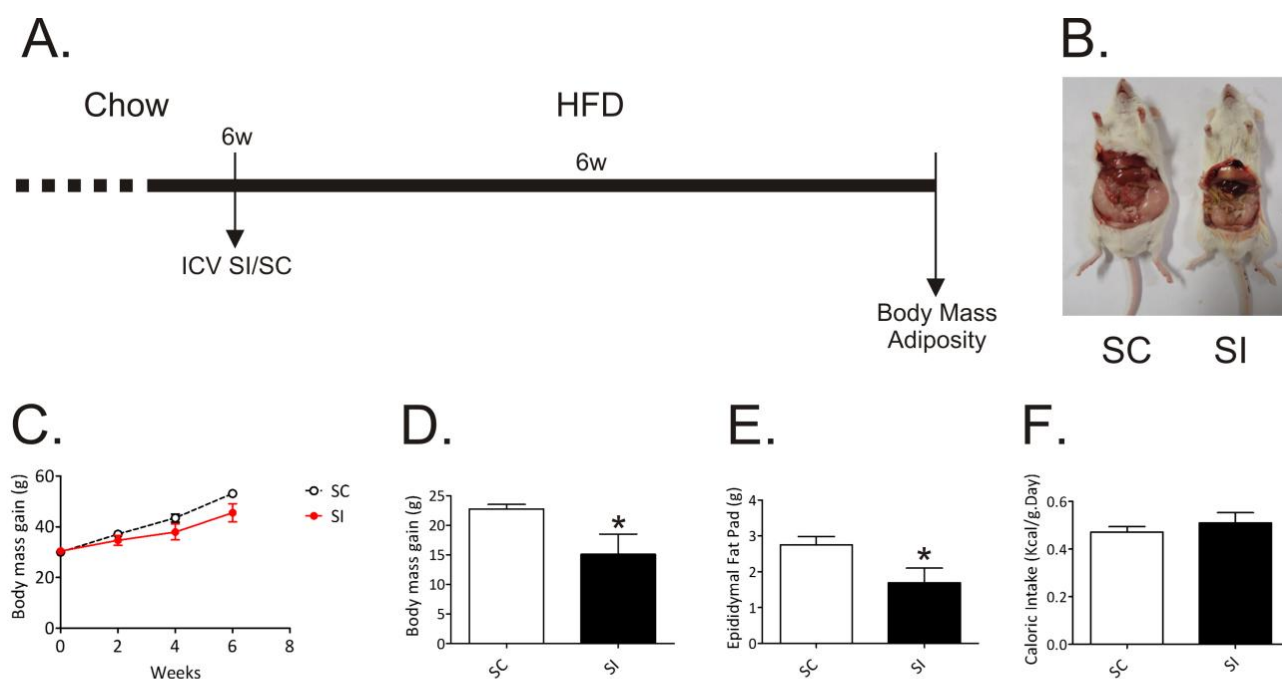
Morari, Fig 5



Morari, Fig 6



Morari, Fig 7



Morari, Fig 8

Durante o período de doutorado a autora participou, como colaboradora, de outros estudos relacionados ao tema de sua tese, os quais são apresentados abaixo:

1. Dragano NR, Marques AY, Cintra DE, Solon C, **Morari J**, Leite-Legatti AV, Velloso LA, Maróstica-Júnior MR. 2013. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *Br J Nutr. Aug*;110(3):447-55.
2. Prada PO, Quaresma PG, Caricilli AM, Santos AC, Guadagnini D, **Morari J**, Weissmann L, Ropelle ER, Carnevali JB, Velloso LA, Saad MJ. 2013. Tub has a key role in insulin and leptin signaling and action in vivo in hypothalamic nuclei. *Diabetes. Jan*;62(1):137-48.
3. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, **Morari J**, Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA. 2012. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One.*;7(1):e30571.
4. Geloneze SR, Geloneze B, **Morari J**, Matos-Souza JR, Lima MM, Chaim EA, Pareja JC, Velloso LA. 2012. PGC1 α gene Gly482Ser polymorphism predicts improved metabolic, inflammatory and vascular outcomes following bariatric surgery. *Int J Obes (Lond). Mar*;36(3):363-8.

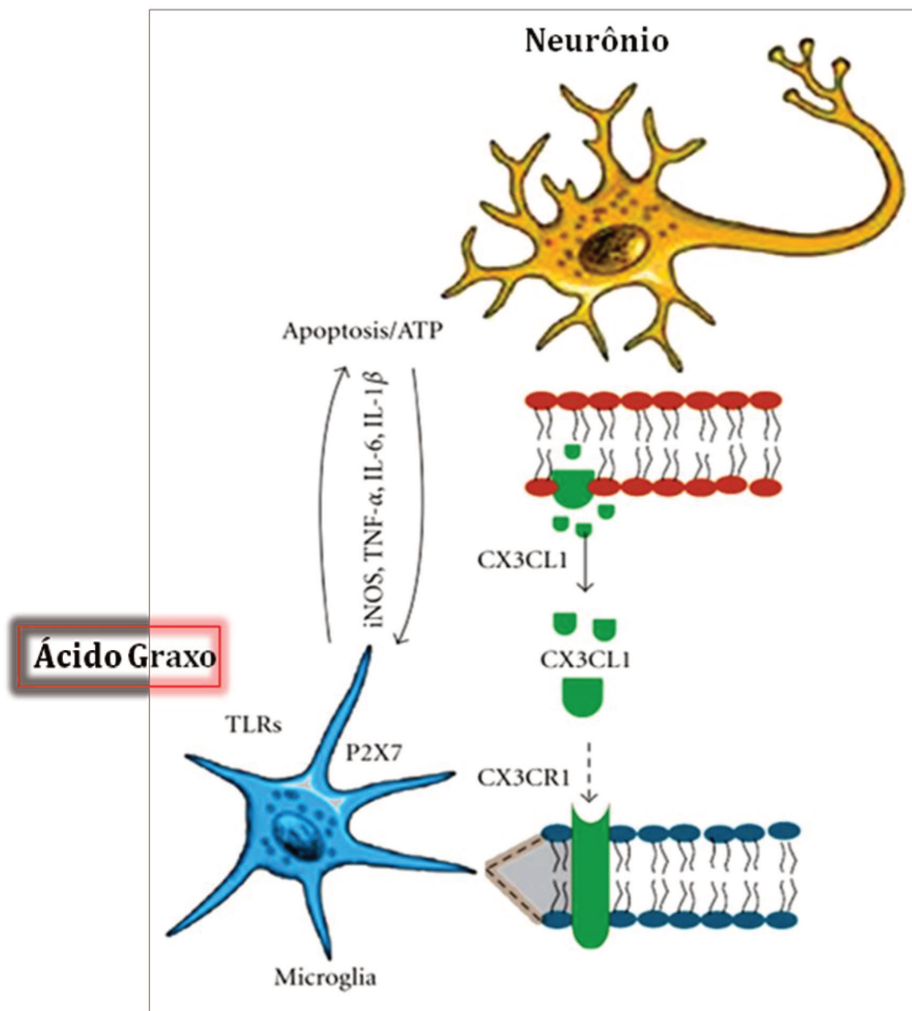
5. Solon CS, Franci D, Ignacio-Souza LM, Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, **Morari J**, Torsoni AS, Carneiro EM, Velloso LA. 2012. Taurine enhances the anorexigenic effects of insulin in the hypothalamus of rats. *Amino Acids*. Jun;42(6):2403-10.
6. de Mendonça RM, de Araújo M, Levy CE, **Morari J**, Silva RA, Yunes JA, Brandalise SR. 2012. Prospective evaluation of HSV, Candida spp., and oral bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer*. May;20(5):1101-7.
7. Politano GT, Passini R, Nomura ML, Velloso L, **Morari J**, Couto E. 2011. Correlation between periodontal disease, inflammatory alterations and pre-eclampsia. *J Periodontal Res*. Aug;46(4):505-11.
8. Calegari VC, Torsoni AS, Vanzela EC, Araújo EP, **Morari J**, Zoppi CC, Sbragia L, Boschero AC, Velloso LA. 2011. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem*. Apr 15;286(15):12870-80.
9. Zanon RG, Cartarozzi LP, Victório SC, Moraes JC, **Morari J**, Velloso LA, Oliveira AL. 2010. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Oct;36(6):515-34.
10. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, **Morari J**, de Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB. 2010. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to

hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* Aug 24;8(8).

11. de Melo CM, Paim BA, Zecchin KG, **Morari J**, Chiaratti MR, Correia MT, Barroso Coelho LC, Paiva PM. 2010. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol Cell Biochem.* Sep;342(1-2):163-9.

A partir dos dados acima apresentados, podemos concluir que:

- Há infiltração de células provindas da medula no hipotálamo de animais submetidos a uma dieta hiperlipídica e essa infiltração é dependente de TLR4 funcional, receptor deflagra vias inflamatórias;
- Animais propensos à obesidade e à inflamação apresentam aumento da quimiocina fractalkina, que está envolvida na infiltração de células da medula para o hipotálamo desses animais;
- A inibição de fractalkina no hipotálamo de animais propensos à obesidade aumenta a infiltração de células derivadas da medula óssea com padrão anti-inflamatório para esta região, tendo como repercussão a melhora do quadro inflamatório hipotalâmico, do metabolismo de glicose e do ganho de peso do animal;
- O aumento de fractalkina no hipotálamo de animais submetidos a um curto tempo de dieta hiperlipídica (1 dia) corrobora para a idéia de que a inflamação hipotalâmica inicial é determinante na gênese e manutenção da obesidade.



Modificado de Desforges N.M et al., 2012.

Figura 2. Hipótese do estudo

3.1 - Animais experimentais

Os animais utilizados neste trabalho são provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todos foram mantidos em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclo artificial de 12 horas de período diurno e 12 horas de período noturno. Foram seguidas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal em todos grupos de animais experimentais.

1) C3H/HeJ e C3H/Hepas - Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C3H/HeJ (mutantes, com perda de função do receptor TLR4) e seu respectivo controle C3H/HePas (selvagem). Os animais com 4 semanas de vida foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por gaiola sendo iniciados em dieta padrão (ração comercial Nuvilab®) até que completassem 5 semanas de vida.

2) C57BL/6 GFP HET – Machos com 4 semanas de vida foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por gaiola sendo iniciados em dieta padrão (ração comercial Nuvilab®).

3) Swiss albinus e Balb-c – Foram utilizados apenas os camundongos machos, que foram acomodados em gaiolas individuais. Esses animais foram divididos em 4 grupos:

- 1) Swiss com dieta padrão (ração - CTR) por 8 semanas e água “*ad libitum*”
- 2) Swiss com dieta hiperlipídica (HFD) por 8 semanas e água “*ad libitum*”
- 3) Balb com dieta padrão (ração - CTR) por 8 semanas e água “*ad libitum*”
- 4) Balb com dieta hiperlipídica (HFD) por 8 semanas e água “*ad libitum*”

Nos grupos acima, os animais saíram do desmame e foram iniciados em dieta padrão (ração comercial Nuvilab®) até que completassem 5 semanas de vida. Após completas cinco semanas de

vida, dois grupos foram iniciados na dieta hiperlipídica (HFD) e outros dois grupos foram mantidos em dieta padrão. Esses animais foram mantidos nas dietas acima descritas por um dia; três dias; uma semana; duas semanas; quatro semanas e oito semanas, sendo depois utilizados para a realização dos experimentos de caracterização metabólica, abaixo descritos.

4) TNFRp55^{-/-} (TNFR1 KO) e seu controle **C57BL/6J** – Machos com 4 semanas de vida foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por gaiola sendo iniciados em dieta padrão (ração comercial Nuvilab®) até que completassem 5 semanas de vida. Em seguida, foram submetidos à dieta padrão ou à dieta hiperlipídica, até que completassem 8 semanas em HFD. Os animais tiveram o hipotálamo extraído e utilizado para análise de genes por PCR em tempo real.

5) IL-10 KO e seu controle **C57BL/6J** – Machos com 4 semanas de vida foram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por gaiola sendo iniciados em dieta padrão (ração comercial Nuvilab®) até que completassem 5 semanas de vida. Em seguida, foram submetidos à dieta padrão ou à dieta hiperlipídica, até que completassem 8 semanas em HFD. Os animais tiveram o hipotálamo extraído e utilizado para análise de genes por PCR em tempo real.

Tabela 1. Composição dos Macronutrientes da Dieta Experimental

	Dieta padrão ¹	Dieta hiperlipídica
Proteína (g %)	22,5	26,0
Gordura (g %)	4,5	35,0
Carboidrato (g %)	55,0	26,0
Fibras (g %)	8,0	6,0
Excipiente (g %)	10,0	7,0
Total	100,0	100,0
Kcal/g	3,5	5,2

¹ (NUVILAB® Cr-1, Nuvital, PR - Brasil)

A dieta hiperlipídica em questão é uma dieta purificada, AIN-93G, modificada para hiperlipídica, contendo 35% de lipídios, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja Sadia®) e 31% de origem animal (gordura suína Sadia®).

3.2 – Medidas de peso e glicemia

As medidas de peso e glicemia foram feitas semanalmente. A glicose sanguínea foi mensurada uma vez por semana, com os animais em jejum de 12 horas com uso de glicosímetro.

3.3 - Teste de leptina intraperitoneal

Para o teste de sensibilidade à leptina, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas (*overnight*). No dia seguinte, receberam 100µl de salina e em seguida receberam ração ou dieta hiperlipídica. Após 3 horas, a ingestão desses animais foi medida. Após 48 horas, os mesmos animais foram novamente mantidos em jejum de 12 horas. No dia seguinte, receberam 100µl de Leptina na

concentração de 1mM e em seguida receberam ração ou dieta hiperlipídica. Após 3 horas, a ingestão desses animais foi medida e comparada com a ingestão obtida no teste com salina.

3.4 – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Os animais foram colocados em jejum por 4 horas. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0) com auxílio de um glicosímetro. Posteriormente, injetamos intra-peritonealmente (IP) uma solução de glicose 25%. A glicemia de cada um dos animais foi medida nos tempo 30, 60, 90 e 120 minutos. Com esses dados foi feita a área sob a curva, na qual é possível estimar o consumo de glicose.

3.5 – Teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina (ipITT)

Os animais foram deixados em jejum por 4 horas. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0) com auxílio de um glicosímetro. Posteriormente, injetamos IP uma solução de insulina humana 0,5U/Kg. A glicemia de cada um dos animais foi medida nos tempo 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Com esses dados foi calculado o kITT, na qual podemos estimar a taxa de decaimento da glicose sanguínea ao longo do tempo.

3.6 - Clamp Euglicêmico – Hiperinsulinêmico

O *clamp* foi realizado nos camundongos *Swiss albinus* e *Balb-c* após 12 horas de jejum. Eles foram anestesiados e submetidos à implantação de cânulas na veia jugular e na artéria femoral. Iniciávamos com um “Bolus” de insulina humana (800mU/Kg de peso). Logo após o “Bolus”, esses animais passavam a receber insulina a uma taxa constante de 0,018ml/min. A injeção de glicose foi iniciada após atingido nível euglicêmico numa taxa necessária para sua manutenção (95-100mg/dl). A

duração do *clamp* teve duração de 120 minutos e as medições de glicemia foram feitas inicialmente a cada 2,5 minutos e após a euglicemia a cada 5 minutos com auxílio de um glicosímetro.

3.7 - Consumo de O₂ e produção de CO₂ (Calorimetria Indireta)

O consumo de O₂, a produção de CO₂ e o Quociente Respiratório (QR) foram determinados por 4 horas em animais alimentados, através de um analisador de gases *LE405 Gas Analyser (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)*. Os animais foram previamente colocados nas câmaras respirométricas por 30 min durante três dias antes do início das medidas, para aclimação. O fluxo de ar foi mantido por um fluxímetro *Air Supply & Switching (Panlab – Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)* e o analisador de gases foi previamente calibrado com concentrações conhecidas de O₂ e CO₂ (Air Liquid, Sao Paulo, Brazil). Os dados foram coletados entre 8h-12h e registros de 6 min para cada animal foram feitos a cada 30 min, e o ar da sala usado como referência. Amostras de ar das câmaras contendo os animais e da sala passaram sequencialmente pelos sensores de O₂ e de CO₂ para determinar a concentração desses gases e medir o consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. O fluxo de O₂ e de CO₂ (VO₂ e VCO₂) foram calculados pelo programa *Metabolism 2.2v* e expressos em mL.h⁻¹.g, baseado na equação de Withers; e o QR foi calculado usando VCO₂/VO₂.

3.8 Extração dos tecidos e Western Blot

Fragmentos de hipotálamo dos animais foram extraídos e submetidos à homogeneização em 1,0 ml de tampão de extração de proteínas (1% Triton-X 100, 100 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/l pirofosfato de sódio, 100 mmol/l fluoreto de sódio, 10 mmol/l EDTA, 10 mmol/l ortovanadato de sódio, 2 mmol/l PMSF, 0.2 mg/ml aprotinina) à 4°C. Os fragmentos celulares foram centrifugados por 30 minutos; 11.000 rpm; 4°C, sendo o sobrenadante utilizado. A determinação do conteúdo de proteínas totais foi realizada pelo método de Biureto, utilizando-se 200µl deste reagente e 4µl de amostra. Posteriormente, foi feita a leitura das proteínas em espectrofotômetro, com comprimento de onda de

540 nanômetros. Após a leitura das amostras, 400µl das mesmas foram armazenadas em tampão de Laemmli contendo 100mM de DTT e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram submetidas à congelamento em freezer -20°C para posterior aplicação em gel de poliacrilamida.

3.9 - Extração de RNA e PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

A extração de RNA total dos tecidos foi realizada segundo método do reagente Trizol (Invitrogen Corporation, CA, USA). Para a produção do cDNA, utilizamos o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 (Applied Biosystems) utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems). Neste sistema é utilizado um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene *GAPD* Rat (TaqMan™ - Applied Biosystems), foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual normaliza a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizamos a validação do sistema gene alvo com o controle endógeno GAPD. Verificamos que as eficiências de amplificação dos primers foram próximas a 100%. Os primers dos genes alvo utilizados foram os seguintes: TNF-α – Mm00443258_m1, IL-1β – Mm00434228_m1, MCP-1 - Mm99999056_m1, CCR2 - Mm00438270_m1, CX3CL1 - Mm00436454_m1, CX3CR1 - Mm00438354_m1, CD11b - Mm00434455_m1, CD36 - Mm01135198_m1, CD163 - Mm00474091_m1 e TLR4 - Mm00445273_m1.

3.10 – Dosagem sérica de insulina e leptina

A dosagem de insulina e leptina foi feita segundo orientações do fabricante Millipore®.

3.11 – Cultura de células neuronais – mHypoA 2/29 Linhagem CLU 189

As células foram cultivadas em meio DMEN 25mM de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e com antibióticos penicilina 50 UI/ml e streptomicina 50 µg/ml. Foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Plaqueamos 2 x 10⁵ células placas de 6 poços e após 24 horas iniciamos o tratamento das células com TNF-α e palmitato. As doses de TNF-α foram 50 e 100ng, enquanto as doses de palmitato foram 180, 270 e 500mM. Primeiramente o tratamento foi feito por 12 horas para que fosse possível estabelecermos a dose ideal para tratamento. Escolhemos a dose de 50ng para TNF-α e 270mM para o palmitato. As células foram então tratadas por 2, 4, 6 e 12 horas. Para o tratamento com palmitato utilizamos meio DMEN, suplementado com 1% de FBS e 0,75% de albumina.

3.12 – Imunofluorescência

3.12.1 - Imunofluorescência de dupla coloração

O hipotálamo foi processado em diferentes concentrações de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), xilol, e xilol/parafina e então incluído em bloco de parafina, seccionados em cortes de 5,0 µm e fixados em lâminas de microscopia previamente silanizadas. Após um repouso de pelo menos 4h a 60°C (para completa fixação dos cortes), as lâminas foram desparafinizadas com xilol, rehidratadas em diferentes concentrações de álcool etílico (100%, 95%, 80% e 70%), e lavadas três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. Em seguida, iniciamos a reação de imunofluorescência, na qual os cortes foram tratados com Triton X-100 2% por 10 min e novamente lavados três vezes com PBS 0,1M, pH 7,4. As lâminas passaram por um período de incubação em solução contendo leite desnatado a 5% para bloquear a

ligação inespecífica do anticorpo, seguidas a exposição por 12h a 4°C, em câmara úmida, a um painel de anticorpos primários, adicionado a todas as lâminas, que foram posteriormente incubadas com anticorpos secundários-conjugados à Rodamina/e ou FITC da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante nuclear DAPI e montadas adequadamente para análise. As análises e documentação dos resultados foram feitos no microscópio Leica FW 4500 B.

3.12.2 - Imunofluorescência Cultura de Célula

A cultura de neurônios foi feita em lâminulas, que foram fixadas com paraformaldeído 4% para início do procedimento. Após a fixação, as lamínulas foram incubadas em solução de bloqueio (solução basal e leite Molico desnatado 5%) para que a ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas fosse reduzida. As lamínulas foram lavadas com PBS 1X para retirada da solução de bloqueio. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos específicos, diluídos em solução basal e leite Molico desnatado 3%, por 4 horas, sendo todos os anticorpos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Ao término da incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X, sendo feita incubação com anticorpo secundário conjugados à Rodamina/e ou FITC da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A diluição desses anticorpos foi feita em solução basal e leite Molico 3%. Após a incubação, as lâminas passaram por nova lavagem com PBS 1X para retirada do excesso de anticorpo secundário e então foram analisadas em microscópio confocal.

3.13 - Inibição gênica com SiRNA (*Small interference RNA*)

A molécula de SiRNA anti fractalkina e Scrambled foram desenhadas com base no banco de dados NCBI pelo Laboratório de Génica Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM).

SiRNA siCX3CL1 sense: 5' GCCGCGUUCUCCAUAU 3'

SiRNA siCX3CL1 anti-sense: 5' ACACACUCCAAGUAGC 3'

Scrambled sense: 5' CAGGCUACUUGGAGUG 3'

Scrambled anti-sense: 5' AUACACUCCAAGUAGC 3'

O SiRNA foi adquirido na forma liofilizada e foi diluído em água livre de DNase e RNase, conjugado e congelado em freezer -80°C. Os animais com 5 semanas de vida foram divididos em 2 grupos, sendo eles **Scrambled** o outro **SiCX3CL1**. O SiRNA foi aplicado através de injeção intracérebro ventricular, sendo utilizado 2µl de uma solução 12,5pM na região do terceiro ventrículo, 2 dias antes do início da dieta hiperlipídica.

3.14 – Imunoablação de medula e transplante

C3H/HeJ e C3H/HePas - Camundongos C3H/HeJ (mutantes para TLR4) ou C3H/HePas (tipo selvagem) foram submetidos a 4 dias de tratamento com antibiótico em água. Utilizamos Bactrin na quantidade de 150uL de antibiótico para cada 100mL de água filtrada (4mg de sulfametoxazol + 0,8mg de trimetoprima/kg/dia). Em seguida, foram expostos à uma dose semi-letal de irradiação (cobalto 60, 8 gray). Após algumas horas, receberam pela veia caudal 5×10^6 células provindas da medula óssea recém-coletadas do fêmur de animais selvagens ou mutantes (conforme grupos descritos abaixo). Estas células foram coletadas assepticamente, lavando-se o fêmur com PBS 1X suplementado com

2% de soro fetal bovino. As amostras foram filtradas e centrifugadas para posterior preparação para o transplante, conforme protocolo previamente descrito (81).

Os animais que sofreram imunoablação de medula foram transplantados com a medula do doador específico, conforme os 4 grupos descritos abaixo:

- 1) C3H/HeJ (mutantes de TLR4): reconstituídos com a medula um doador C3H/HeJ (mutante de TLR4);
- 2) C3H/HePas (tipo selvagem): reconstituídos com a medula de um doador C3H/HeJ (mutante de TLR4);
- 3) C3H/HePas (tipo selvagem): reconstituídos com a medula de um doador C3H/HePas (tipo selvagem);
- 4) C3H/HeJ (mutantes de TLR4): reconstituídos com a medula um doador C3H/HePas (tipo selvagem);

Após a ablação da medula e transplante, os animais foram mantidos em mini-isoladores para recuperação e tratados com antibiótico diluídos em água 4 dias antes e 1 semana após o transplante. Posteriormente, os animais foram alimentados por 8 semanas com ração comercial ou dieta hiperlipídica (Tabela 1) e água “*ad libitum*”.

Swiss albinus e c57 GFP – Os camundongos *Swiss albinus* também foram imunoblados, conforme metodologia acima descrita. Entretanto, receberam pela veia caudal uma quantidade de 5×10^6 células de medula óssea recém-coletadas dos *c57 GFP*. Em seguida, foram mantidos na ração e água “*ad libitum*” até completarem 8 semanas de vida e receberam através de injeção única ICV siRNA contra CX3CL1 ou Scrambled. Após 48 horas, esses animais foram submetidos à dieta hiperlipídica por 2 semanas e em seguida utilizados para experimentos de imunofluorescência em microscópio confocal.

3.15 – Extração hipotalâmica para análise em Citometria de Fluxo

O protocolo utilizado para homogeneizar o hipotálamo de camundongos e realizar as marcações com anticorpos específicos foi modificado de (82).

Camundongos Swiss com 5 semanas de vida receberam uma injeção ICV de SiCX3CL1 ou Scrambled. Após 2 dias foram submetidos à uma dieta hiperlipídica por 2 semanas. O hipotálamo desses animais foi removido e picotado em uma placa de petri com 1,5ml de tampão fosfato 1X (PBS 1X), no gelo, até obtenção de pedaços bastante pequenos. Esses pequenos pedaços foram transferidos para um tubo de 2ml e passaram por uma centrifugação de 30 segundos, a 3000rpm para obtenção de um pellet. O PBS 1X foi descartado e ao pellet foi adicionado 1ml de Tripsina (250mg/ml). Essa solução foi incubada por 5 minutos a 37°C, sendo então agitada por pipetagem, até se observar o início da dissolução dos pedaços hipotalâmicos. A incubação ocorreu por mais 5 minutos e novamente foi feita a agitação por pipetagem até que a solução ficasse completamente homogênea. Para inibição da ação enzimática da Tripsina, foi adicionada à solução 1ml de meio DMEM, 10% de FBS. Em seguida, essa solução foi passada por uma membrana de nylon de 100µM e coletada em tubo cônico. A membrana foi lavada com mais 2 ml de DMEM 10%FBS e seguiu-se à centrifugação por 3 minutos, a 1500rpm. O meio DMEM foi descartado e o pellet lavado com PBS1X, passando novamente por centrifugação. O PBS 1X foi descartado e o pellet dissolvido em PBS 1X. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e 10^5 células foram diluídas em 100µl de PBS 1X. Anticorpos específicos foram adicionados a essa solução, que foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, em abrigo de luz. Finalmente, as células foram lavadas, centrifugadas e finalmente diluídas em 300µl de PBS 1X para análise em citômetro de fluxo.

3.16 – Análise dos resultados

Para comparações entre as duas cepas de camundongos submetidos a diferentes dietas, foram realizadas análises de variância (ANOVA *two-way*). Para comparação entre a mesma cepa de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e ração, realizamos teste t de student. Havendo diferença entre os grupos, foram aplicados testes de comparações múltiplas *pos hoc* Bonferroni.

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
2. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, and He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008;32(9):1431-7.
3. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, and Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
4. Farooqi S, and O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocrine reviews*. 2006;27(7):710-18.
5. Hofman MA, and Swaab DF. The human hypothalamus: comparative morphometry and photoperiodic influences. *Progress in brain research*. 1992;93(133-47; discussion 48-9.
6. Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, and Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(4):951-8.
7. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
8. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, and Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annual review of psychology*. 2000;51(255-77.
9. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004;116(2):337-50.
10. Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. *Obesity*. 2006;14 Suppl 1(1S-8S.
11. Belgardt BF, and Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1212(97-113.
12. Carnevali JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, and Saad MJ. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS letters*. 2001;500(3):119-24.
13. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, and Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8514-9.
14. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(2):359-70.
15. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, and Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-

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

16. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, Cintra DE, Fernandes MF, Flores MB, Velloso LA, et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *The Journal of physiology*. 2006;577(Pt 3):997-1007.
17. Araujo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carnevali JB, Saad MJ, and Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2007;148(12):5991-7.
18. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, and Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(12):1827-32.
19. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, and Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996;348(9021):159-61.
20. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, and Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(4):1543-9.
21. Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
22. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, and Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(11):4854-8.
23. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, and Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146(10):4192-9.
24. Unger EK, Piper ML, Olofsson LE, and Xu AW. Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology*. 2010;151(2):671-82.
25. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, and Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73.
26. Thaler JP, and Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*. 2010;151(9):4109-15.
27. Howard JK, and Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17(9):365-71.
28. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, and Yoshimura A. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nature medicine*. 2004;10(7):739-43.
29. Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Myers MG, Jr., and Xu AW. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes*. 2010;59(4):894-906.

30. Picardi PK, Calegari VC, Prada PO, Moraes JC, Araujo E, Marcondes MC, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, and Saad MJ. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology*. 2008;149(8):3870-80.
31. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, and Kahn BB. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nature medicine*. 2006;12(8):917-24.
32. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, and Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(21):14230-41.
33. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre AL, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(9):2577-89.
34. Schenk S, Saberi M, and Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):2992-3002.
35. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(1):153-62.
36. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.
37. Hines DJ, Choi HB, Hines RM, Phillips AG, and MacVicar BA. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. *PloS one*. 2013;8(3):e60388.
38. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
39. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, and Bruning JC. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell metabolism*. 2009;10(4):249-59.
40. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(4):521-33.
41. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr., and Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell metabolism*. 2009;9(1):35-51.
42. Cunha DA, Hekerman P, Ladriere L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, Moore F, Rasschaert J, Cardozo AK, Bellomo E, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 14):2308-18.
43. Coope A, Milanski M, Arruda AP, Ignacio-Souza LM, Saad MJ, Anhe GF, and Velloso LA. Chaperone insufficiency links TLR4 protein signaling to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(19):15580-9.

44. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PloS one*. 2009;4(4):e5045.
45. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, and Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 2004;304(5667):110-5.
46. Horvath TL. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity*. 2006;14 Suppl 5(228S-33S).
47. Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14875-80.
48. Kettenmann H, Kirchhoff F, and Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013;77(1):10-8.
49. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011;333(6048):1456-8.
50. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, and Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature neuroscience*. 2011;14(10):1227-35.
51. Gordon S, and Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
52. Lawson LJ, Perry VH, and Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1992;48(2):405-15.
53. de Groot CJ, Hupples W, Sminia T, Kraal G, and Dijkstra CD. Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia*. 1992;6(4):301-9.
54. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
55. Cuadros MA, and Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in neurobiology*. 1998;56(2):173-89.
56. Haramizu S, Nagasawa A, Ota N, Hase T, Tokimitsu I, and Murase T. Different contribution of muscle and liver lipid metabolism to endurance capacity and obesity susceptibility of mice. *Journal of applied physiology*. 2009;106(3):871-9.
57. Florio T, Casagrande S, Diana F, Bajetto A, Porcile C, Zona G, Thellung S, Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, et al. Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha induces proliferation and growth hormone release in GH4C1 rat pituitary adenoma cell line through multiple intracellular signals. *Molecular pharmacology*. 2006;69(2):539-46.
58. Walz A, Peveri P, Aschauer H, and Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987;149(2):755-61.

59. Laing KJ, and Secombes CJ. Chemokines. *Developmental and comparative immunology*. 2004;28(5):443-60.
60. Mackay CR. Chemokines: what chemokine is that? *Current biology : CB*. 1997;7(6):R384-6.
61. Moser B, and Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature immunology*. 2001;2(2):123-8.
62. Gerard C, and Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature immunology*. 2001;2(2):108-15.
63. Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, and Feng L. NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(4):577-84.
64. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, and Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385(6617):640-4.
65. Kaplan AP. Chemokines, chemokine receptors and allergy. *International archives of allergy and immunology*. 2001;124(4):423-31.
66. Julia V. CX3CL1 in allergic diseases: not just a chemotactic molecule. *Allergy*. 2012;67(9):1106-10.
67. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, and Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(10):1541-7.
68. Surmi BK, and Hasty AH. The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascular pharmacology*. 2010;52(1-2):27-36.
69. Cefalu WT. Fractalkine: a cellular link between adipose tissue inflammation and vascular pathologies. *Diabetes*. 2011;60(5):1380-2.
70. Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, Mehta NN, Li M, Qu L, Lu Y, Putt ME, Ahima RS, and Reilly MP. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60(5):1512-8.
71. Surmi BK, Webb CD, Ristau AC, and Hasty AH. Absence of macrophage inflammatory protein-1{alpha} does not impact macrophage accumulation in adipose tissue of diet-induced obese mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;299(3):E437-45.
72. Jones BA, Beamer M, and Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Molecular interventions*. 2010;10(5):263-70.
73. Ikejima H, Imanishi T, Tsujioka H, Kashiwagi M, Kuroi A, Tanimoto T, Kitabata H, Ishibashi K, Komukai K, Takeshita T, et al. Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010;74(2):337-45.
74. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, and Flier JS. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*. 2007;56(9):2242-50.
75. Ransohoff RM, and Stevens B. Neuroscience. How many cell types does it take to wire a brain? *Science*. 2011;333(6048):1391-2.

76. Tarozzo G, Bortolazzi S, Crochemore C, Chen SC, Lira AS, Abrams JS, and Beltramo M. Fractalkine protein localization and gene expression in mouse brain. *Journal of neuroscience research*. 2003;73(1):81-8.
77. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*. 2006;9(7):917-24.
78. Reaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostene W, and Melik Parsadaniantz S. Current status of chemokines in the adult CNS. *Progress in neurobiology*. 2013;104(67-92).
79. Chapman GA, Moores K, Harrison D, Campbell CA, Stewart BR, and Strijbos PJ. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(15):RC87.
80. Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, and Foster AC. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *The European journal of neuroscience*. 2004;20(5):1150-60.
81. Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, and Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2006;49(4):489-502.
82. Camacho A, Rodriguez-Cuenca S, Blount M, Prieur X, Barbarroja N, Fuller M, Hardingham GE, and Vidal-Puig A. Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response. *Experimental neurology*. 2012;237(2):396-406.