

Avaliação da atividade biológica de preparações homeopáticas de antiadiponectina em camundongos submetidos a dieta hipercalórica

Maíra B. Martins¹; Lucienne C. Martini¹; Leoni V. Bonamin^{2*}

Resumo

A adiponectina foi originalmente identificada como uma proteína expressa e produzida por adipócitos do tecido gorduroso abdominal de várias espécies animais, cuja função é manter a homeostase do tecido adiposo em relação às demandas energéticas do corpo. Preparações homeopáticas de substâncias endógenas são capazes de modular diferentes funções celulares. Neste projeto, buscou-se conhecer os possíveis efeitos de uma preparação homeopática de anticorpos antiadiponectina no controle do depósito adiposo subcutâneo abdominal, utilizando-se modelo experimental. Quarenta camundongos Swiss machos adultos foram divididos em um grupo experimental e 3 controles. Os animais foram alimentados durante 1 mês e 7 dias com suplemento dietético comercial e tratados simultaneamente, por via oral, com antiadiponectina 6cH. Foi avaliado o ganho de peso corporal, bem como características macro e microscópicas do tecido adiposo subcutâneo e do fígado. Os resultados mostraram discreta redução no ganho de peso e redução estatisticamente significativa no diâmetro dos adipócitos no grupo experimental. Não foram observadas alterações inflamatórias ou degenerativas significativas no fígado. Os mecanismos envolvidos nestas alterações metabólicas precisam ser pesquisados em estudos futuros.

Palavras-chave

Adiponectina; Tecido adiposo; Ganho de peso; Homeopatia; Modelo experimental; Camundongos

Biological activity of homeopathic preparations of adiponectin in mice subjected to a hypercaloric diet

Abstract

Adiponectin was originally identified as a protein expressed and produced by the abdominal fat adipocytes of several animal species which function is to maintain the homeostasis of the adipose tissue vis-à-vis the body energy demands. Homeopathic preparations of endogenous substances are able to modulate several cell functions. In the present study we investigated possible effects of a homeopathic preparation of anti-adiponectin antibodies on the control of the abdominal fat by means of an experimental model. Forty Swiss male adult mice were fed a commercial dietary supplement for 1 month and 7 days and treated with anti-adiponectin 6cH per oral route. Parameters assessed were weight gain and macro- and microscopic characteristics of the subcutaneous adipose tissue and liver. The experimental group exhibited slightly less weight gain and statistically significant reduction of the adipocyte diameter. We did not detect significant inflammatory or degenerative changes in the liver. The mechanisms involved in the detected changes need to be investigated in future studies.

Keywords

Adiponectin; Adipose tissue; Weight gain; Homeopathy; Experimental model; Mice

* Universidade de Santo Amaro–UNISA; Universidade Paulista–UNIP, São Paulo, Brasil ✉
leonibonamin@gmail.com

Introdução

A adiponectina, também conhecida como GBP-28, apM1, AdipoQ e Acrp30, é uma proteína expressa exclusivamente nos adipócitos diferenciados [1]. Ao contrário de outros fatores secretados pelo tecido adiposo, ela age como fator protetor de doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina. Sua ação anti-inflamatória e antiaterogênica se dá pela diminuição da expressão da molécula de adesão 1 (via redução da expressão de TNF alfa e atividade da resistina), diminuição da quimiotaxia aos macrófagos pela formação de células gordurosas e inibição da sinalização inflamatória do tecido endotelial. Ela aumenta a sensibilidade à insulina por meio de aumento da oxidação de ácidos graxos e da captação e utilização de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo, por aumento da oxidação de gordura por ativação da enzima adenina monofosfato quinase. Consta que na medida em que o tecido adiposo aumenta, sua expressão diminui progressivamente [2]. É um hormônio proteico responsável por diversos processos metabólicos, incluindo a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos.

A adiponectina é secretada pelo tecido adiposo na corrente sanguínea e os níveis plasmáticos estão inversamente relacionados com o percentual de gordura corporal em adultos. Esse hormônio possui um importante papel na supressão de eventos metabólicos que podem levar ao diabetes tipo 2, à obesidade, à aterosclerose e à doença hepática gordurosa. A adiponectina também possui ação sobre o sistema nervoso central. Intervenções nutricionais e terapêuticas que melhoram a sensibilidade à insulina, tais como restrição antigênica e perda de peso aumentam a expressão gênica de adiponectina, bem como o seu conteúdo circulante. O TNF alfa e a IL-6 são potentes inibidores da expressão e secreção de adiponectina. Foi verificado que a administração de adiponectina recombinante reduz a glicemia e melhora a resistência à insulina em modelos de ratos obesos e diabéticos [2]. Outras pesquisas realizadas constataram efeitos do sulfato de dietilbestrol na expressão do gene da adiponectina em obesos, sobretudo na gordura visceral e abdominal (omento), porém nenhum efeito foi visto em tecido adiposo subcutâneo abdominal [3].

Estudos realizados mostraram que o excesso de peso e o diabetes mellitus tipo 2 são fatores de risco para câncer pancreático, sendo caracterizados por uma diminuição dos níveis de adiponectina. Como a adiponectina possui uma importante ação na regulação do metabolismo da glicose, Grote e colaboradores [4] pesquisaram amostras de sangue de 420 pacientes portadores de câncer pancreático. Entretanto, a adiponectina não mostrou associação com o risco de câncer pancreático. Em contrapartida, em outro estudo, realizado pelo mesmo grupo foram constatado altos níveis de adiponectina sérica, associados a redução do risco de câncer pancreático em indivíduos não fumantes, no entanto, para os fumantes não foi constatada associação significativa.

Os efeitos da aldosterona na produção de adiponectina e na produção de fator inibidor de plasminogênio (PAI-1) são as bases de mecanismo de resistência insulínica, síndrome metabólica e doença cardiovascular [5].

A disfunção endotelial está associada a diversas alterações vasculares, como aterosclerose, hipertensão arterial, hiperlipidemia e diabetes mellitus, que têm em comum a resistência à insulina. Nesses casos, as principais fontes de citocinas (adipocinas) são representadas pelo tecido adiposo subcutâneo e visceral. Assim, o aumento da massa de tecido adiposo está associado a alterações da produção de adipocina e aumento da expressão de fator de necrose tumoral, IL-6 e PAI-1 e diminuição da expressão de adiponectina no tecido adiposo. A condição pró-inflamatória associada a essas alterações sugere ligação entre resposta imune e disfunção endotelial no estágio inicial do processo de aterosclerose, em indivíduos obesos e em pacientes

com diabetes tipo 2. A redução da massa de tecido adiposo por redução de peso associada ao exercício físico reduz as citocinas envolvidas, aumenta os níveis de adiponectina e melhora tanto a sensibilidade à insulina quanto a função endotelial [6]

Cada forma oligomérica da adiponectina apresenta propriedades biológicas distintas e ativam diferentes vias de sinalização celular em diversos tecidos. Atividade hepatoprotetora tem sido descrita em vários estudos clínicos e experimentais. Em humanos, níveis reduzidos da adiponectina sérica, característicos da obesidade, representam um fator de risco independente para a doença hepática gordurosa não-alcóolica, incluindo variados graus de disfunção hepática. Em animais, a elevação dos níveis circulantes de adiponectina, por manipulação genética ou farmacológica, conduz a uma atenuação da hepatomegalia, da esteatose e da hepatite necrótica, usualmente associadas a várias doenças hepáticas. No animal sem o gene da adiponectina (*knockout*), existe uma condição preexistente de esteatose e disfunção mitocondrial que contribui para a vulnerabilidade desses animais aos processos de lesões teciduais hepáticas induzidas pela obesidade e outras condições [7].

Trabalhos recentes comprovaram que o tecido adiposo interage com outros órgãos por meio das adipocinas – adiponectina, resistina e leptina, evidenciando, assim, sua função secretora. Por outro lado, o estresse oxidativo oriundo do desequilíbrio entre os radicais livres e defesas antioxidantes, afeta o metabolismo celular, tendo como alvo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos; altera também a via de síntese dos eicosanoides, dentre eles, as prostaglandinas, que têm um papel importante na diferenciação dos adipócitos [8].

Muitos modelos experimentais de altas diluições foram desenvolvidos utilizando moléculas endógenas de importância para o sistema imune [9]. Youbicier-Simo e colaboradores [10–12] concluíram que o tratamento de embriões de galinha com altas diluições de bursina (peptídeo produzido pela bursa de Fabrício e fundamental para a maturação de linfócitos B nas aves) restaurou a resposta linfocitária B de aves bursectomizadas *in ovo*, assim como modulou os níveis de corticosterona e ACTH plasmáticos, o que indica um papel importante na harmonia da rede neuroimunoendócrina.

Experimentos realizados com tiroxina em solução altamente diluída e sucussionada mostraram modificações significativas na metamorfose e no desenvolvimento de girinos [13–17]. Entre estes estudos, os mais conhecidos são aqueles onde se utilizou histamina ultradiluída para inibição de degranulação e modulação de basófilos *in vitro* [18–24].

Estudos desenvolvidos pelo grupo de Bonamin e colaboradores mostram que a administração de timulina preparada homeopaticamente na potência 5cH e adicionada à água de bebida, diminuiu de forma estatisticamente significativa os efeitos mielosupressores da ciclofosfamida em camundongos portadores do tumor de Ehrlich e aumentou 27 vezes a área de metaplasia óssea do tumor implantado na pata dos animais [25]. Da mesma forma, regula a resposta inflamatória, tanto na leishmaniose cutânea, produzindo padrão granulomatoso e reduzindo a infecção [26], quanto na lesão granulomatosa induzida por BCG [27].

A literatura indica que a regulação endócrina do tecido adiposo depende de um contexto mais amplo, envolvendo a participação da resposta imune e de mediadores inflamatórios. Por outro lado, há evidências experimentais de que preparações altamente diluídas de moléculas endógenas conhecidas podem modular várias funções fisiológicas, metabólicas e inflamatórias, incluindo a resposta imune.

Kuzeff e colaboradores [28] demonstraram que preparações homeopáticas do estereoisômero (-)U50488 – um agonista opioide sintético – foram mais eficazes para reduzir a toxicidade do

seu correspondente, (+)U50488, comparadas à ação da preparação isopática simples, em que se utilizou o próprio (+)U50488 diluído. Outros estudos similares foram realizados pelo mesmo grupo, inclusive com outras substâncias, como propanolol [29,30]. Kuzeff *et al.* [28] apontaram para a dificuldade de se obter isômeros de peptídeos e de outras moléculas complexas.

Tais informações reunidas suscitaram a seguinte questão: na impossibilidade de se obter estereoisômeros de peptídeos, poderiam preparações homeopáticas de anticorpos antissubstâncias endógenas ter efeitos biológicos mensuráveis? Partindo deste pressuposto, formulamos a hipótese de que preparações homeopáticas de antiadiponectina poderiam modular a dinâmica do tecido adiposo subcutâneo abdominal em relação à distribuição de gordura em nível sistêmico, bem como a atividade inflamatória intrínseca de tal tecido.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis modificações no acúmulo de gordura intracelular hepática e subcutânea abdominal em camundongos tratados com preparações homeopáticas de antiadiponectina.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados 40 camundongos Swiss machos adultos, provenientes do biotério da Universidade Santo Amaro, mantidos em condições controladas de temperatura e umidade (22 ± 3 °C; 70% umidade) com ciclo de luz controlado 12:12 horas.

Bioética

O presente projeto foi aprovado pelo CEUA-UNISA, sob o protocolo 41/2011, estando de acordo com a legislação vigente na época de sua execução.

Medicamentos

Preparações homeopáticas 6cH de anticorpo antiadiponectina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) foram feitas em solução hidroalcoólica 30%, segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3ª edição, em farmácia credenciada pela ANVISA.

Antes da administração dos medicamentos, foi feita a troca das etiquetas dos frascos do medicamento e do veículo por códigos (A e B) por uma pessoa do laboratório que não participou do experimento. As etiquetas originais e os respectivos códigos foram fixados em uma folha de papel e a mesma foi lacrada em envelope pardo, o qual foi mantido em segurança durante toda a condução do experimento. Os códigos foram revelados somente após o término de todas as análises estatísticas. Sendo assim, toda a condução do estudo foi realizada em cego.

Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, sendo: Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, sendo: 1) *Controle-branco*: 10 camundongos alimentados apenas com a ração balanceada *ad libitum* e mantidos sem tratamento por 37 dias; 2) *Controle-carboidrato*: 10 camundongos alimentados 5 vezes por semana durante 37 dias com ração balanceada e suplemento de carboidrato comercial (*junk food*); 3) *Controle-veículo*: 10 camundongos alimentados 5 vezes por semana durante 37 dias com ração balanceada e suplemento de carboidrato comercial (*junk food*), sendo tratados por via oral com solução hidroalcoólica 6CH pelo mesmo período e frequência, sendo o volume igual a 10 μ L/10 gramas de peso; e 4) *Experimental*: 10 camundongos alimentados 5 vezes por semana durante 37 dias com ração balanceada e suplemento de carboidrato comercial (*junk*

food), sendo tratados por via oral com anti-adiponectina 6CH pelo mesmo período e frequência, sendo o volume igual a 10 µL/10 gramas de peso.

Os animais foram pesados 5 vezes por semana, imediatamente antes da administração dos medicamentos. Ao final do período de 37 dias, os mesmos foram submetidos a eutanásia por injeção de cloreto de potássio 10% intraperitoneal após sedação com xilazina e quetamina e, em seguida, necropsiados. O consumo de água, ração e carboidrato foi calculados por gaiola.

Necropsia

O fígado de cada animal foi retirado e pesado a fresco. Um fragmento padrão de um dos lobos foi retirado e fixado em formol tamponado 10% por 8 horas e mantido em álcool 70% até o processamento histológico convencional.

A pele abdominal foi retirada e sobreposta em cartolina com a face subcutânea aderida ao papel. Um fragmento retangular de 10 mm² foi colhido, pesado e sua espessura foi medida com um paquímetro. O material recolhido foi posteriormente fixado em formol 10% por no máximo 8 horas, tal como o fragmento hepático.

Do material fixado foi feito exame histopatológico com coloração de hematoxilina e eosina para observação das características qualitativas e quantitativas dos tecidos.

Análise histopatológica

Para cada animal foram retiradas 15 fotomicrografias, sendo 10 da região hipodérmica da pele e 5 do fígado, escolhidas aleatoriamente.

Foi avaliado o diâmetro de cada célula adiposa presente nos campos microscópicos fotografados da pele (hipoderme) e foi feita a contagem do número de células inflamatórias presentes neste mesmo campo, usando o programa *Image J*.

Para a avaliação dos cortes de fígado foram atribuídos escores de esteatose (entre 0 e 3) e escores de inflamação (entre 0 e 2) para cada fotomicrografia registrada.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média e desvio padrão. A análise estatística das variáveis paramétricas foi feita por ANOVA, seguida de Tukey ou MANOVA (ANOVA de duas vias), segundo o caso. As variáveis não paramétricas (escores) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Peso corporal

Todos os grupos apresentaram ganho de peso médio por gaiola ao longo dos 37 dias de experimento, porém sem significância estatística (dados não mostrados). Contudo, o ganho de peso entre o primeiro e o último dia de experimento (delta) foi maior no grupo 2, que recebeu apenas dieta hipercalórica, sem tratamento (Figura 1).

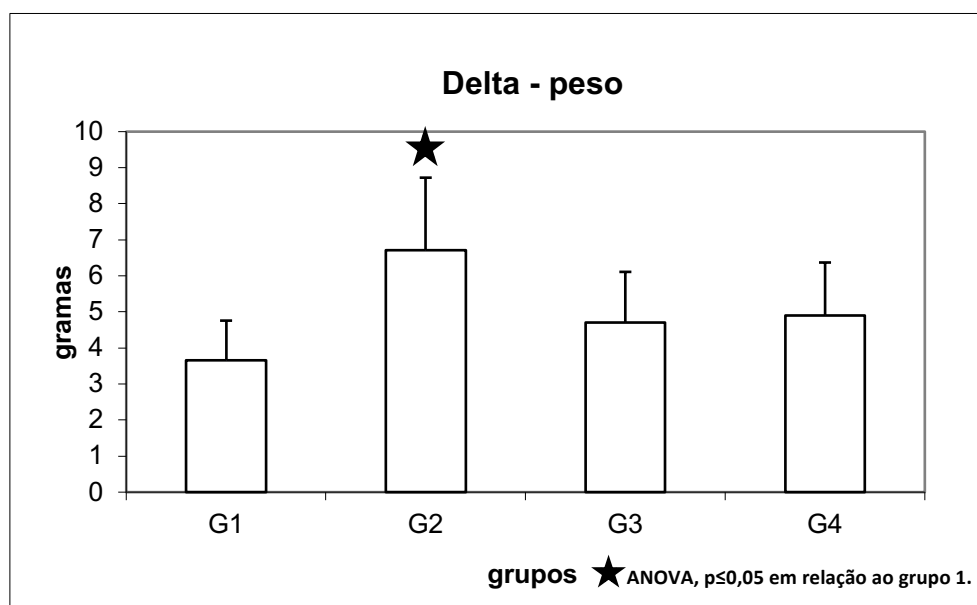


Figura 1. Ganho de peso entre o primeiro e o último dia do experimento (delta). Valores expressos em média \pm desvio padrão' ANOVA, Tukey, $p \leq 0,05$ em relação ao controle (G1)

Média de consumo de água, ração e carboidrato

O consumo de ração foi reduzido nos grupos que receberam carboidrato suplementar, pois os animais deram preferência ao carboidrato em relação à ração, em função da alta palatabilidade do primeiro (Figura 2). Não houve diferença significativa no consumo de carboidrato e de água entre os grupos (dados não mostrados).

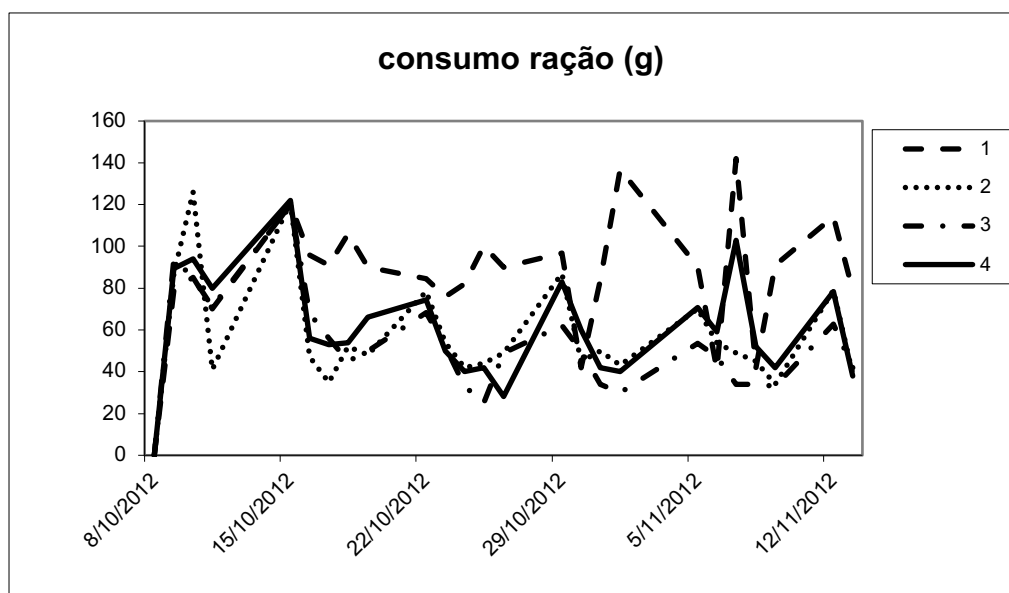


Figura 2. Consumo diário de ração por gaiola; MANOVA.

Alterações macroscópicas

Nenhuma alteração macroscópica foi encontrada nos fragmentos coletados quanto à espessura da pele nem no peso do fígado (dados não mostrados).

Alterações histopatológicas

A análise histométrica revelou maior número de adipócitos no grupo 4, porém o grupo 2 apresentou adipócitos maiores em relação ao controle – grupo 1 (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro dos adipócitos em pixels (DA) e número de adipócitos (NA) nos diferentes grupos. Os valores representam média e erro padrão. (*) $p=0,03$; ANOVA, Tukey, em relação ao controle (G1)

Grupo	Média DA (x 10 ³)	Média NA
1 (controle)	13,2 ± 1,2	115,2 ± 6,7
2	19,5 ± 1.1(*)	94,2 ± 8,1
3	12,9 ± 1,4	101,2 ± 8
4	13,6 ± 1,9	151,0 ± 26,7(*)

O cálculo da razão entre área e número dos adipócitos revelou ser maior no grupo 2 em relação aos demais (Figura 3).

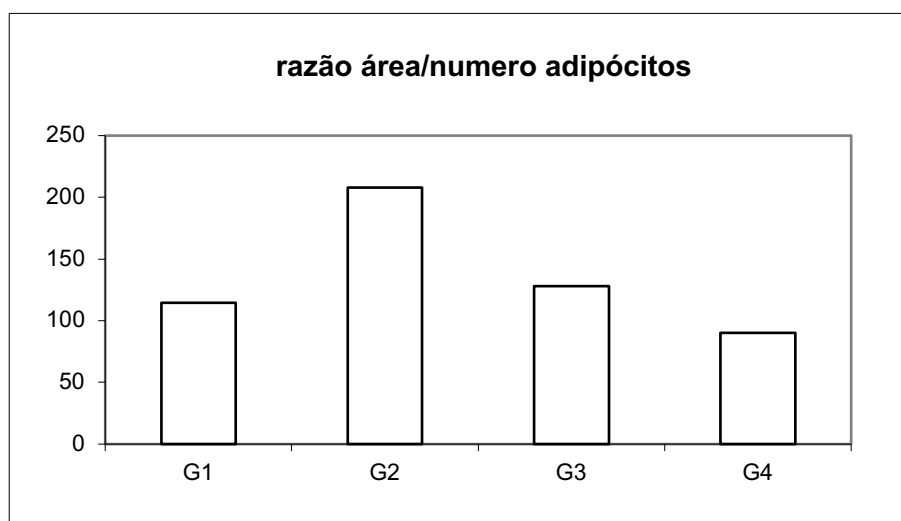


Figura 3. Razão entre a área média de adipócitos e o número de adipócitos por campo microscópico.

Os escores de inflamação do tecido subcutâneo (de 0 a 3), inflamação hepática e escore de esteatose (não apresentaram significância estatística entre os grupos. (dados não mostrados).

Discussão

Os dados colhidos durante o experimento mostram aspectos peculiares. Os animais que receberam alimentação adicional com carboidrato comercial (*Junk food*) sem qualquer tratamento concomitante mostraram aumento do ganho de peso durante o período experimental em relação ao controle. Por outro lado, aqueles que receberam tratamento adicional, com veículo (solução hidroalcoólica) ou antiadiponectina 6cH mostraram perfil intermediário de ganho de peso, porém sem significância estatística em relação ao controle.

O consumo de ração balanceada foi ligeiramente maior no grupo controle, mas sem significância estatística, em relação aos demais, mostrando que os animais provavelmente preferiram se alimentar com a fonte de carboidrato antes de buscar a ração, possivelmente por razões de palatabilidade.

Os demais parâmetros clínicos e anatomopatológicos, como consumo de água e carboidrato (medido por grupo e não individualmente), espessura da pele (epiderme, derme e hipoderme), peso do fígado, escore de inflamação da hipoderme e do fígado e escore de vacuolização do citoplasma dos hepatócitos (esteatose) não diferiram entre os grupos. Tais parâmetros constituem uma baliza importante para analisar o status metabólico dos animais alimentados com o suplemento de carboidrato, com ou sem tratamento adicional. Assim sendo, nenhuma alteração significativa indicadora de estados patológicos importantes foi observada.

As mudanças estatisticamente significativas observadas se deram apenas numa análise mais delicada do tecido adiposo. Os animais alimentados com carboidrato adicional mostraram aumento da área dos adipócitos, denotando maior acúmulo de triglicerídeos no citoplasma dessas células. A proporção entre tamanho dos adipócitos e quantidade de gordura armazenada é diretamente proporcional. O tratamento com antiadiponectina 6cH, por sua vez, induziu aumento do número absoluto de adipócitos ($p=0,03$) por campo em relação ao controle e também menor relação área/número de adipócitos por campo microscópico. Tais efeitos foram específicos do medicamento homeopático, não sendo identificados nos animais tratados com o veículo.

Em suma, as alterações histométricas dos adipócitos nos animais tratados com antiadiponectina 6cH sugerem o estabelecimento de um padrão adaptativo do tecido gorduroso à maior disponibilidade de gordura alimentar, resultando na inibição parcial do ganho de peso, o que não foi observado no controle não tratado.

O consumo estável de ração e de carboidrato entre os grupos, sem diferença estatística, revela também que as variações histológicas não foram condicionadas a eventuais mudanças comportamentais associadas aos hábitos alimentares, mas a possíveis efeitos metabólicos do tratamento em si.

Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo [31,32] mostram que a dieta hipercalórica durante a puberdade ou a privação alimentar durante a gestação induzem padrões pró-inflamatórios sistêmicos e no sistema nervoso central, em especial no hipotálamo, mas também em outras áreas do sistema límbico e córtex [33,34]. Tais padrões morfofuncionais têm reflexos transgeracionais, ou seja, podem ser herdados pelas gerações seguintes, por herança fenotípica (não genética). Em todos esses casos, os métodos histométricos foram suficientemente sensíveis para apontar tais mudanças adaptativas nas diferentes gerações, em consonância com os efeitos metabólicos esperados em ambas as situações alimentares. No presente estudo, a histometria do tecido adiposo também mostrou ser uma ferramenta suficientemente sensível para mostrar os efeitos do medicamento estudado.

Com a dieta hipercalórica, o hipotálamo parece ser um especialmente sensível a programações epigenéticas: trata-se de região envolvida no controle da ingestão alimentar e do gasto energético; é no hipotálamo que a expressão do apetite é quimicamente codificada [35,36] por meio do balanço entre neuropeptídeos orexígenos (NPY, AgRP) e anorexígenos (Alfa-MSH, CART). Assim, os neurônios que expressam esses neuropeptídeos interagem uns com os outros e com sinais periféricos como leptina, insulina, grelina e glicocorticoides [36]. Os receptores para estes sinais estão concentrados no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo [37].

A leptina e a insulina são hormônios críticos no controle da ingestão de alimentos, sendo secretados em proporção à massa adiposa [38]. A leptina atua no hipotálamo e promove a sensação de saciedade, enquanto que a insulina, produzida nas células beta do pâncreas, aumenta a captação periférica de glicose pelas células do organismo [39] e regula a ação da leptina no hipotálamo [40], além de interferir na secreção de entero-hormônios [41,42]. Indivíduos obesos têm elevadas concentrações de insulina e leptina, cujas funções no SNC apresentam resistência por hipo-expressão de seus receptores [43].

Dentre os fatores de regulação hipotalâmicos associados à ingestão de alimentos, destacam-se os estímulos inflamatórios e a participação de células da glia, especialmente os astrócitos, na regulação dos centros da fome e saciedade [44,45], o que inclui a resistência à insulina e leptina. Tal resistência é uma consequência da superexpressão de receptores para leptinas seguida de endocitose. Sabe-se que a exposição à dieta hipercalórica é capaz de modificar a morfologia e a função dos astrócitos hipotalâmicos, aumentando o número de sinapses entre essas células e os neurônios vizinhos [46,47].

Quanto às alterações periféricas, sabe-se que a gordura visceral e subcutânea são indicadores fiéis de alterações epigenéticas decorrentes da alimentação [48,49], tendo como origem o próprio mesotélio peritoneal suscetível a estímulos hormonais [50]. Adipócitos aumentados, como observado nos indivíduos obesos, produzem e liberam grande quantidade de citocinas e adipocinas, as quais recrutam células inflamatórias. Os macrófagos, em especial, amplificam essa resposta ao migrarem para o tecido adiposo [51].

Tal fato motivou o estudo dos padrões inflamatórios da hipoderme e do fígado, mas não foram observadas alterações nesses órgãos no modelo experimental proposto. Talvez a exposição dos animais à oferta de carboidratos por um tempo maior poderia revelar tais lesões.

A adiponectina tem papel preponderante no desenvolvimento de esteatose não alcoólica [52]. Segundo Yamauchi et al. [53], a adiponectina atua estimulando a proteína quinase dependente de AMP, o que consequentemente acelera a oxidação dos ácidos graxos nos hepatócitos, sugerindo que os anticorpos antiadiponectina altamente diluídos também poderiam modular o metabolismo das gorduras de forma sistêmica e não apenas localizada. Sabe-se que a adiponectina superexpressa aumenta a diferenciação de pré-adipócitos, concomitantemente à expressão de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias [54] e imunomoduladoras [55]. A adiponectina é um sinalizador de stress metabólico, capaz de ativar a resposta imune inata, com a participação de macrófagos, tanto em condições patológicas quanto fisiológicas [55]. Por esse motivo, a pesquisa do processo inflamatório no fígado e na gordura subcutânea foi escolhida como parâmetros de quantificação, no presente estudo.

Conclusões

Os resultados indicam que a preparação homeopática antiadiponectina 6cH apresentou certo efeito na prevenção do acúmulo de gordura subcutânea abdominal em animais alimentados

com suplemento calórico, contudo, os mecanismos envolvidos ainda permanecem desconhecidos, necessitando de estudos futuros.

Referências

1. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48:803-811.
2. Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizurini DM, Tavares do Campo M. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr.* 2007;20:549-559.
3. Morante JJH, Milagro F, Gabaldon JA, Martínez JA, Zamora S, Garaulet M. Effect of DHEA-sulfate on adiponectin gene expression in adipose tissue from different fat depots in morbidly obese humans. *Soc Eur J Endocrinol.* 2006;155:593-600.
4. Grote VA, Rohrmann S, Nieters A, Dossus L, Alkjaer J, Overvad K. The association of circulating adiponectin levels with pancreatic cancer risk: a study within the prospective EPIC cohort. *Int J Cancer.* 2012;130(10):2428-2437.
5. Li P, Zhang K, Pan C et al. Aldosterone perturbs adiponectin and PAI-1 expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res.* 2011;43(7):464-469.
6. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:304-312.
7. Wang Y, Zhou M, Lam KSL, Xu A. Adiponectina e seu papel na proteção contra a doença hepática gordurosa na obesidade: mecanismos e implicações terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:201-212.
8. Silva NER, Soares AF. Dosagem de adiponectina e prostaglandina D2 e E2 em adipócitos submetidos ao estresse. *JEPEX*, 2010. Disponível em: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0014-1.PDF>
9. Bastide, M. Interpretative theories about ultra-dilutions: supporting evidences. *Cultura Homeop.* 2006;16:22-30, 2006.
10. Youbicier-Simo BJ, Boudard F, Guellati M, Mekaouche M, Baylé JD, Bastide M. The role of the Bursa de Fabricius and highly dilute bursin in immunoendocrine interactions in the chickens. In: M. Bastide, ed. *Signal and Images*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1997, p. 111-121.
11. Youbicier-Simo BJ, Boudard F, Mekaouche M, Bastide M, Baylé JD. Effects of embryonic bursectomy and in ovo administration of highly diluted bursin on adrenocorticotrop and immune responses of chickens. *Int J Immunotherapy.* 1993;9:169-180.
12. Youbicier-Simo BJ, Boudard F, Mekaouche M, Baylé JD, Bastide M. A role for bursa Fabricii and bursin in the ontogeny of pineal biosynthetic activity in the chicken. *J Pineal Res.* 1996;21:35-43.
13. Endler PC, Pongratz W, Kastberger G, Wiegant FA, Schulte J. The effect of highly diluted agitated thyroxine on the climbing activity of frogs. *Vet Hum Toxicol.* 1994;36:56-59.
14. Endler PC, Pongratz W, Smith CW, Schulte J. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regard to homeopathic toxicology. *Vet Hum Toxicol.* 1995;37:259-260.
15. Endler PC, Ludtke R, Heckmann C et al. Pretreatment with thyroxine (10^{-8} parts by weight) enhances a "curative" effect of homeopathically prepared thyroxine (10^{-1}) on lowland frogs. *Forsch Komplementarmed Naturheild.* 2003;10:137-142.
16. Weber S, Endler PC, Welles SU et al. The effect of homeopathically prepared thyroxine (10^{-30} parts by weight) on highland frogs: influence of electromagnetic fields. In: Bonamin LV, ed. *Signals and images: Contributions and contradictions of high dilution research*. Dordrecht: Springer; 2008, p. 137-149.
17. Guedes JRP. Glândula tireoidiana de *Rana catesbeiana* em ultradiluição homeopática altera a velocidade de metamorfose de girinos da mesma espécie [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

18. Belon P, Cumps J, Ennis M. et al. Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multi-centre trial. *Inflamm Res.* 1999;48(suppl 1):17-18.
19. Belon P, Cumps J, Ennis M. et al. Histamine dilutions modulate basophil activation. *Inflamm Res.* 2004;53:181-188.
20. Brown V, Ennis M. Flow-cytometric analysis of basophil activation: inhibition by histamine at conventional and homeopathic concentrations. *Inflamm Res.* 2001;50(suppl 2):47-48.
21. Sainte-Laudy J. Modulation of allergen and anti-IgE induced human basophil activation by serial histamine dilutions. *Inflamm Res.* 2000;49:5-6.
22. Lorenz I, Schneider EM, Stolz P, Strube J. Influence of the diluent on the effect of highly diluted histamine on basophil activation. *Homeopathy.* 2003;92:11-18.
23. Sainte-Laudy J, Belon P. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions: a novel basophil specific marker: CD203c. *Homeopathy.* 2005;95:3-8.
24. Chirumbolo S, Brizzi M, Ortolani R, Vella A, Bellavite P. Inhibition of CD203c membrane up-regulation in human basophils by high dilutions of histamine: a controlled replication study. *Inflamm Research.* 2009;58:755-764.
25. Toledo RL. Associação timulina- isoterápico de ciclofosfamida no tratamento de camundongos portadores de tumor de Ehrlich. [dissertação]. Universidade Paulista, São Paulo, 2005.
26. Rodrigues de Santana F, Coelho C de P, Cardoso TN, Laurenti MD, Perez Hurtado EC, Bonamin LV. Modulation of inflammation response to murine cutaneous leishmaniasis by homeopathic medicines: thymulin 5cH. *Homeopathy.* 2014;103(4):275-84.
27. Bonamin LV, Sato C, Zalla Neto R et al.. Immunomodulation of homeopathic thymulin 5cH in a BCG-induced granuloma Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:686018.
28. Kuzeff RM, Topashka-Ancheva M, Metcheva R. Isopathic versus enantiomeric inhibition of U-50488 HCl toxicity – experimental studies. *Homeopathy.* 2009;98:83-87.
29. Kuzeff RM, Topashka-Ancheva M, Metcheva R. Inhibition of (-)-trans-(1S, 2S)-U50488 hydrochloride by its enantiomer in white mice: a placebo-controlled, randomized study. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheikd.* 2004;11:144-149.
30. Kuzeff RM, Metcheva RP, Topashka-Ancheva M. Inhibition of (-)-propranolol hydrochloride by its enantiomer in white mice: a placebo-controlled randomized study. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheikd.* 2004;11:14-19.
- 31 Joaquim AO, Coelho CP, Motta PD et al. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reprod Fertil Dev.* 2017; 29(2):325-335.
- 32 Joaquim AO, Coelho CP, Motta PD et al. Maternal food restriction in rats of the F0 generation increases retroperitoneal fat, the number and size of adipocytes and induces periventricular astrogliosis in female F1 and male F2 generations. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(7):1340-1348.
- 33 Molina J, Joaquim A, Bonamin LV et al. Reduced astrocytic expression of GFAP in the offspring of female rats that received hypercaloric diet. *Nutr Neurosci.* 2018;20:1-11.
- 34 Ogassawara TB, Joaquim A, Coelho CP et al. Food deprivation in F0 generation and hypercaloric diet in F1 generation reduce F2 generation astrogliosis in several brain areas after immune challenge. *Int J Dev Neurosci.* 2018;64:29-37.
- 35 Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JÁ, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001;74: 683-701.
- 36 Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16:623-637.
- 37 Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999;20:68-100.
- 38 Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science.* 1998;280:1378-1383.

- 39 Schwartz MV. Staying slim with insulin in mind. *Science*. 2000;289:2066-2067.
- 40 Suyeon K, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of adipocyte. *J Nutr*. 2000;130:311S-315S.
- 41 Halpern ZSC, Rodrigues MB, Costa RF. Physiological determinants of weight and appetite control. *Rev Psiq Clín*. 2004;31:150-153.
42. Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgaard Madsen J, Juul Holst J, Astrup A. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety-effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25:1206-1214.
43. Kong AP, Chan NN, Chan JC. The role of adipocytokines and neurohormonal dysregulation in metabolic syndrome. *Curr Diabetes Ver*. 2006;2:397-407.
44. García-Cáceres C, Yi CX, Tschöp MH. Hypothalamic astrocytes in obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013. doi:10.1016/j.ecl.2012.11.003.
45. Guyenet SJ, Nguyen HT, Hwang BH et al. High-fat diet feeding causes rapid, non-apoptotic cleavage of caspase-3 in astrocytes. *Brain Res*. 2013;1512:97-105.
46. Chowen JÁ, Argente J, Horvath TL. Uncovering novel roles of nonneuronal cells in body weight homeostasis and obesity. *Endocrinology*. 2011;154(9):3001-3007.
47. Buckman LB, Thompson MM, Moreno HN, Ellacott KL. Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. *J Comp Neurol*. 2013;521:1322-1333.
48. Ross MG, Desai M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. *Clin Obstet Gynecol*. 2003;56: 529-536.
49. Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol*. 2007;92:287-298.
50. Chau YY, Bandiera R, Serrels A et al. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol*. 2014;16:367-75.
51. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SR, Zanella MT. Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simple association. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):230-8.
- 52 Ma H, You GP, Cui F et al. Effects of a low-fat diet on the hepatic expression of adiponectin and its receptors in rats with NAFLD. *Ann Hepatol*. 2015;14(1):108-117.
53. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-1295.
54. Yang W, Yang C, Luo J, Wei Y, Wang W, Zhong Y. Adiponectin promotes preadipocyte differentiation via the PPAR γ pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):428-435.
55. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):120-8