

SIMONE COGHETTO ACEDO

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE FATORES
PRODUZIDOS PELO TECIDO ADIPOSEO NA
DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM
MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO***

Bragança Paulista

2010

SIMONE COGHETTO ACEDO

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE FATORES
PRODUZIDOS PELO TECIDO ADIPOSEO NA
DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM
MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO*.**

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Gambero

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação
stricto sensu em Ciências da
Saúde da Universidade São
Francisco (USF) para
obtenção da qualificação
para o exame de defesa de
tese de Mestrado.

Bragança Paulista

2010

WD 210 Acedo, Simone Coghetto.
A157a Avaliação da participação de fatores produzidos pelo tecido adiposo na diferenciação de monócitos em macrófagos humanos *in vitro* / Simone Coghetto Acedo. -- Bragança Paulista, 2010.
59 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Alessandra Gambero.

1. Obesidade. 2. Adipocitocinas. 3. Macrófagos.
4. Tecido adiposo. I. Gambero, Alessandra. II. Título.

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



ACEDO, Simone Coghetto. "Avaliação da participação de fatores produzidos pelo tecido adiposo na diferenciação de monócitos em macrófagos humanos *in vitro*". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em trinta de Junho de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Gambero - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Prof^ª. Dr^ª. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco

Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Érica Bighetti Ribas
Universidade São Francisco

À minha família

“O meu eterno agradecimento pela paciência e apoio aos meus planos e expectativas. Ao meu pai por sempre me mandar estudar. À minha mãe que sempre cuidou para que isso tudo fosse possível. À minha irmã que sempre me deu aquele ‘empurrãozinho’. E ao meu irmão, que sempre arranjava um jeito de rirmos de tudo. Foram momentos aflitos, de impaciência e até de raiva, que foram superados porque tenho vocês ao meu lado, meu presente de Deus, minha família.” Obrigada por tudo.

Agradecimentos

À Professora Dra. Alessandra Gambero por tudo. Por acreditar em meu trabalho, em meu esforço, que algumas vezes foi maior que o sucesso de alguns experimentos, por me ensinar todos os dias não somente ciência, mas também valores, por me fazer compreender a importância do que faço e por me ajudar, mesmo quando está incrivelmente ocupada! Obrigada mesmo!

À Professora Dra. Irene Lorand-Metze, por supervisionar as análises de citometria de fluxo realizadas no Hemocentro da UNICAMP.

Ao Departamento UNIFAG – USF pela utilização dos laboratórios.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento.

Aos colegas do laboratório: Érica, Demétrius, Eloá, Tanila, Karin, Thayane, Natália, Waldemar, Beatriz, Aline, Juliana e Prof. Dr. Marcelo, obrigada por tudo que aprendi no laboratório.

Aos meus amigos: Elizangela, Evandro, Daniela, Felipe por me ouvirem e por todo o apoio. À Caroline, por me ajudar tanto em tudo durante os quatro anos na mesma jornada! Ao Filipe por ser tão especial em minha vida.

Por último, entretanto não menos importante, aos voluntários.

“Quando você elimina o impossível, o que sobra por mais incrível que pareça só pode ser a verdade.”

Sir. Arthur Conan Doyle

LISTA DE ABREVIATURAS

FEV - Fração Estromal Vascular

IL - Interleucinas

IFN - Interferons

IL-6 - Interleucina 6

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

MCP-1 - (*Monocyte Chmoattractant Protein-1*) Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1

MIP-1 α - (*Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*) Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 alfa

RANTES - *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted*

IMC – Índice de Massa Corpórea

NK - *Natural Killer*

NKT - *Natural Killer T*

CD - *Cluster of Differentiation*

LPS - Lipopolissacarídeo

INF- γ - Interferon γ

M1 - Fenótipo de macrófagos classicamente ativados

IL-12 - Interleucina 12

iNOS - Óxido Nítrico Sintase induzida

TGF- β - Transforming Growth Factor- β

ICAM - *Intercellular Adhesion Molecule 1*

Th1 - *T helper 1*

Th2 - *T helper 2*

IL-4 - Interleucina 4

IL-13 - Interleucina 13

IL-10 - Interleucina 10

M2 - Fenótipo de macrófagos alternativamente ativados

M2b - Fenótipos de macrófagos diferenciados por Interleucina 10

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

Fc- γ - *Fragment crystallizable- γ*

IL-1ra - antagonista de receptor de Interleucina-1

IL-1 β - Interleucina-1 β

CCR2^{-/-} - Deficiência na produção de receptores de quimiocina

MGL1 - *Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1*

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

GM-CSF - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor*

M-CSF - *Macrophage colony-stimulating factor*

IL-3 - Interleucina 3

Ca²⁺ - íon Cálcio

MAPK - (*Mitogen-activated protein kinase*) Proteína Kinase Ativadora de Mitose

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

JAK2 - *Janus kinase 2*

PKC - Proteína kinase C

PLC - Fosfolipase C

apM1 - *AdiPose Most abundant Gene transcript 1*

mg - miligramas

ml - mililitro

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

ACD - Acid-citrate-dextrose

µl - Microlitros

cm² - centímetros quadrados

ng - nanogramas

µg - microgramas

NaCl - Cloreto de Sódio

PMSF - *phenylmethylsulfonyl fluoride*

Na₃VO₄ - Ortovanadato de Sódio

NaF - Fluoreto de Sódio

Na₄P₂O₇ - Pirofosfato de Sódio

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

rpm - rotações por minuto

min - minutos

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

e_{pm} - Erro Padrão da Média

ANOVA – Análise de variância

U - unidades

LEP - leptina

ADI - adiponectina

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lep 25 - Células diferenciadas na presença de leptina 25 ng/ml

Lep 50 - Células diferenciadas na presença de leptina 50 ng/ml

Adi 1 - Células diferenciada na presença de adiponectina 1,0 µg/ml

Adi 2,5 - Células diferenciadas na presença de adiponectina 2,5 µg/ml

NS - Células não estimuladas

Mac-1 - antígeno-1 do macrófago

CR3 - receptor complemento 3

PIGF - *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F*

TLR - *Toll-like receptor*

COX - Cicloxigenase

CCL - Ligantes de quimiocinas

CCR - Receptores de quimiocinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão de VEGF em macrófagos cultivados na presença de IFN- γ , IL-4, Lep 25 ou Lep 50;

Figura 2. Níveis de TNF- α liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 3. Níveis de IL-6 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 4. Níveis de IL-1 β liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 5. Níveis de IL-10 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 6. Níveis de IL-1ra liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 7. Níveis de MCP-1 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 8. Níveis de MIP1- α liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 9. Níveis de RANTES liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinação de anticorpos para citometria de fluxo.

Tabela 2: Expressão das moléculas de superfície.

RESUMO

O tecido adiposo é composto por adipócitos, células endoteliais e leucócitos, principalmente macrófagos (MA). O infiltrado de MA está aumentado em indivíduos obesos e, a capacidade destas células em secretar citocinas depende de seu fenótipo, que pode variar entre M1, pró-inflamatório e M2, antiinflamatório. Acredita-se que a exposição às citocinas produzidas pelo microambiente contribua para este fenótipo. Deste modo, este trabalho teve como objetivo estudar a influência da leptina (Lep) e adiponectina (Adi), duas substâncias produzidas pelo tecido adiposo, no fenótipo final de monócitos diferenciados em macrófagos *in vitro*.

Para tanto, sangue periférico de voluntários sadios foi coletado e células mononucleares foram obtidas por centrifugação deste em Ficoll-Paque®. Células CD14⁺ foram isoladas por imunomagnetismo (MACS®). Monócitos foram diferenciados com os estímulos clássicos IFN- γ (M1) e IL-4 (M2) ou na presença de Lep (25 e 50 ng/ml) e Adi (2,5 e 1 μ g/ml). Após a diferenciação, marcadores de superfície foram analisados por citometria de fluxo. MA foram estimulados com TNF- α , LPS ou IFN- γ e a produção de citocinas foi avaliada por ELISA.

Células diferenciadas em M1 e Lep expressam mais CD14 que células diferenciadas em M2. Receptores CD163, CD80 e CD86 também tiveram expressão semelhante em M1 e Lep. Entretanto, outros marcadores como CD36, CD40, CD200, CD209 e CD11b apresentaram expressão intermediária entre M1 e M2 nas células diferenciadas na presença de Lep 25, 50 e Adi 2,5. Células M2 produzem menos TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 e MIP-1 α quando estimuladas por LPS, comparado à células M1 ou diferenciadas com Lep ou Adi. No entanto, células diferenciadas com Lep e Adi não foram capazes de produzir RANTES como M1, após estímulo com LPS. A produção de IL-10 não diferiu entre os grupos, enquanto a produção basal de IL-1ra foi reduzida nas células diferenciadas com Lep.

Portanto, a exposição dos monócitos a Lep e Adi resulta em MA que expressam marcadores de superfície próximos ao observado em células isoladas do tecido adiposo, as quais produzem citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos similares ao fenótipo M1, característica também descrita para macrófagos do tecido adiposo.

ABSTRACT

Adipose tissue is formed by adipocytes, endothelial cells and leukocytes, mainly macrophages. Macrophage infiltration is increased in obesity and the ability to produce cytokines depends on its pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype. Substances produced in a microenvironment can interfere with monocyte/macrophage differentiation process and modify the cell phenotype. The aim of this work was to evaluate if adipocytokines such as leptin and adiponectin contribute to macrophage phenotype.

Mononuclear cells were obtained from healthy human blood by centrifugation in Ficoll-Paque®. CD14⁺ cells were isolated by MACS®. Classical differentiation stimulus IFN- γ (M1) and IL-4 (M2) were used as control. Leptin (25 and 50 ng/ml) and adiponectin (2.5 and 1 μ g/ml) were also added to CD14⁺ cell cultures. Surface markers were analyzed by flow cytometry (FACsCalibur-BD). The basal and stimulated (LPS) cytokine production was measured by ELISA in culture supernatant.

M1 and leptin (25 and 50) cells express more CD14, CD163, CD80 and CD86 than M2 cells. However, CD36, CD40, CD200, CD209 and CD11b expression was intermediate between M1 and M2 cells. M2 cells produce less TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 and MIP-1 α when stimulated by LPS compared with M1, Lep and Adi macrophages. However, leptin and adiponectin cells had no ability to produce RANTES as M1 cells. IL-10 production was not changed, while IL-1ra was reduced in Lep cells.

The leptin presence during macrophage differentiation induces surface markers expression as observed in adipose tissue macrophage. Leptin and adiponectin produce cells with high ability to release pro-inflammatory cytokines and chemokines also similar to M1 phenotype and adipose tissue macrophage.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Obesidade e Inflamação	01
1.2. Infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo	02
1.3. Macrófagos no tecido adiposo e sua relação com adipócitos	03
1.4. Fatores secretados pelo tecido adiposo: adipocitocinas	08
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Isolamento de monócitos e geração de macrófagos	15
3.2. Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo	16
3.3. Análise da expressão de proteínas por imunoblotting	17
3.4. Ensaio celular de produção de citocinas e quimiocinas	18
3.5. Análise dos resultados	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Expressão de moléculas de superfície analisadas por citometria de fluxo:	19
4.2. Expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) analisada por Western blot:	21

4.3. Produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos	22
4.4. Produção de citocinas antiinflamatórias por macrófagos	25
4.5. Produção de quimiocinas por macrófagos	27
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8. ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Obesidade e Inflamação*

A obesidade tem alcançado proporções epidêmicas no mundo. Comumente associada com países de alta renda, a obesidade é agora também predominante em países de média e baixa renda. Pelo menos 2,6 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado de doenças associadas ao excesso de peso (World Health Organization, 2010). Reconhecida como um estado de baixo grau inflamatório, causada por um distúrbio do equilíbrio energético, a obesidade aumenta a prevalência de desordens metabólicas, cardiovasculares e doenças do fígado (Robbins, 1999). Atualmente, o crescimento da prevalência da obesidade tem atraído grande interesse da ciência no estudo da biologia do tecido adiposo, órgão que se apresenta em estado de hipertrofia nos indivíduos obesos.

O tecido adiposo é composto por uma variedade de células, sendo os adipócitos os mais abundantes. Os demais tipos celulares presentes neste tecido constituem a fração estromal vascular (FEV) que inclui fibroblastos, pré-adipócitos, constituintes vasculares e leucócitos. (Curat et al., 2004; Suganami et al., 2005).

Conceituar tecido adiposo como simples local de armazenamento e estocagem de gordura é uma definição ultrapassada à medida que diversos estudos mostraram sua função, também, como um órgão secretor. Além de ser a principal reserva de energia em eucariontes superiores, armazenando triacilglicerol em períodos de excesso de energia e realizando sua mobilização durante períodos de privação, o tecido adiposo secreta substâncias que participam de respostas inflamatórias e imunológicas, de eventos vasculares, da regulação do apetite, do controle das funções reprodutivas e do controle da secreção e sensibilidade à insulina, por exemplo (Gregoire et al., 1998; Kershaw e Flier, 2004). Dentre os fatores secretados pelo tecido adiposo, estão as citocinas e quimiocinas, coletivamente designadas como adipocinas ou adipocitocinas.

As citocinas, incluindo interleucinas (IL) e interferons (IFN), podem ser peptídios ou glicopeptídeos. Dentre suas inúmeras funções, em paralelo com outros sinais

oriundos do contato célula-célula, proporcionam uma rede de comunicação envolvida em cada função da resposta imune, além de induzir divisão e diferenciação de certos tipos de célula (Roitt et al., 1997). As adipocitocinas são proteínas produzidas por adipócitos ou células residentes no tecido adiposo, como citado anteriormente, que regulam importantes funções no organismo. Quando atuam como agentes modificadores da resposta inflamatória, podem ser classificadas como pró- ou antiinflamatórias. Dentre as mais conhecidas estão: leptina, resistina, visfatina, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, classificadas como pró-inflamatórias e, a adiponectina e IL-10, como antiinflamatórias. Pode-se citar também a produção pelo tecido adiposo de proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1, MIP-1 α e RANTES que são quimiocinas consideradas pró-inflamatórias (Fantuzzi G., 2005; Godoy-Matos, 2006; Gambero et al., 2007).

Alterações no equilíbrio de produção de adipocitocinas anti- e pró-inflamatórias, bem como no perfil de produção de quimiocinas parecem estar relacionadas ao infiltrado de células inflamatórias que se modifica em função do estágio de expansão do tecido adiposo.

1.2. Infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo

As células inflamatórias ou células imunes compõem uma importante e grande parcela do tecido adiposo. Cerca de 20% do tecido adiposo são neutrófilos, linfócitos e macrófagos infiltrados (Caspar-Bauguil et al., 2009).

Migração celular é uma característica essencial para processos fisiológicos e patológicos. A capacidade migratória de células do sistema imunológico é uma característica obrigatória para a vigilância imune, na qual leucócitos, em geral, migram da circulação para tecidos adjacentes e destroem microorganismos invasores e células infectadas (Lang e Ratke, 2009). Em vários processos inflamatórios, infecciosos ou não-infecciosos a inflamação crônica é caracterizada pela presença de células mononucleares que é geralmente precedida pela infiltração tecidual de neutrófilos, que são células que caracterizam a inflamação aguda (Schymeinsky et al., 2007).

O infiltrado de células do sistema imunológico no tecido adiposo também obedece a uma ordem cronológica. Trabalho realizado por Elgazar-Carmom et al. em 2008 demonstrou, pela primeira vez, que neutrófilos infiltram o tecido adiposo após três dias do início da dieta hiperlipídica em camundongos. Os mesmos autores também demonstraram em cultura celular *in vitro* a ocorrência de adesão entre adipócitos e neutrófilos. Após oito semanas de introdução da dieta hiperlipídica, observou-se o aumento do infiltrado de macrófagos em camundongos C57BL/6 (Weisberg et al., 2003). Baseado nestes achados define-se que o tecido adiposo desenvolve um estado de inflamação crônica, característico da obesidade, que envolve um infiltrado de monócitos e macrófagos bem caracterizado e a secreção de citocinas que atraem outros leucócitos, sendo que este infiltrado se correlaciona positivamente com dois índices de adiposidade: índice de massa corpórea e tamanho dos adipócitos (Weisberg et al., 2003).

Mas não há apenas monócitos/macrófagos e neutrófilos no tecido adiposo; uma parcela importante dos leucócitos infiltrados é composta por linfócitos que desempenham importantes funções durante a obesidade. Apesar da grande variação na proporção de diferentes tipos de linfócitos em função da localização anatômica do tecido adiposo, todos os tipos de linfócitos são encontrados, como as células NK (*Natural Killer*) e NKT (*Natural Killer T*), que pertencem ao sistema imune inato, linfócitos B e $\alpha\beta$ T (CD4⁺ ou CD8⁺), que pertencem ao sistema imune adaptativo, e linfócitos $\gamma\delta$ T que representam uma ponte entre imunidade inata e adaptativa (Caspar-Bauguil et al., 2009).

1.3. Macrófagos no tecido adiposo e sua relação com adipócitos

Macrófagos são células mielóides, bem como as células dendríticas, os neutrófilos, eosinófilos e os mastócitos (Jenmalm et al., 2006). São células versáteis,

comumente classificadas como fagócitos mononucleares e residem em quase todos os tipos de tecido onde são identificados como populações com funções, morfologias e localizações distintas. No fígado, macrófagos são chamados de células Kupffer; no tecido ósseo, eles formam os osteoclastos multinucleados no periósteo; no sistema nervoso central, eles compreendem a micróglia posicionados entre neurônios e nos rins, eles formam a rede que envolve os glomérulos como as células mesangiais. Encontramos também macrófagos e seus precursores infiltrados no tecido adiposo, como mencionado, porém neste tecido suas funções ainda não foram totalmente elucidadas (Gordon, 1995; Weisberg et al., 2003). Estudos realizados por Bornstein et al. (2000), demonstram que macrófagos são encontrados em contato direto com adipócitos maduros. Os macrófagos desempenham funções fagocíticas (*scavenger*), reconhecendo, englobando e realizando a digestão de microorganismos patogênicos e/ou substâncias que desencadeiam respostas inflamatórias, como o lipopolissacarídeo (LPS). Também secretam moléculas que atraem outras células imunes para áreas de infecção, atuam como mediadores primários da resposta imune inata, além de participar da imunidade adaptativa como células apresentadoras de antígenos para as células T (Janeway et al., 2006)

Desde que os macrófagos foram encontrados no tecido adiposo e que se observou que o número de macrófagos aumentava na mesma proporção ao aumento da obesidade em um indivíduo, ocorreram diversas especulações sobre sua possível participação no aumento da massa gorda, de maneira similar à descrita em tumores (Curat et al., 2004; Aron-Wisnewsky et al., 2009).

Macrófagos residentes do tecido adiposo podem ser derivados de monócitos ou pré-adipócitos. Os monócitos são considerados tanto como precursores dos macrófagos ou como macrófagos imaturos, pois migram para os tecidos e assumem o fenótipo final de macrófagos. A exposição de monócitos à citocinas, componentes da matriz extracelular ou outros fatores produzidos em um microambiente, podem ser fatores determinantes para o fenótipo final desta célula (Dupasquier et al., 2006).

Macrófagos diferenciados na presença de IFN- γ ou lipopolissacarídeo (LPS) eram inicialmente chamados de macrófagos classicamente ativados e hoje são classificados como fenótipo M1. Macrófagos M1 têm como característica principal a

produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6, TNF- α , iNOS, TGF- β , proteína C reativa, ICAM solúvel e MCP-1 (Hotamisligil et al., 1993; Samad et al., 1997; Fried et al., 1998; Visser et al., 1999; Perreault e Marette, 2000; Sartipy e Loskutoff, 2003). A alta expressão dessas citocinas resulta em efeitos no metabolismo, por exemplo, a produção de TNF- α diminui diretamente a sensibilidade à insulina e aumenta a lipólise nos adipócitos (Hotamisligil et al., 1994; Zhang et al., 2002). A IL-6 leva à hipertrigliceridemia, *in vivo*, por estimular a lipólise e a secreção de triglicérides hepáticos. (Nonogaki et al., 1995). Os M1 são ainda capazes de induzir respostas em células Th1 (Zeyda et al., 2007). Este fenótipo está associado com a inflamação devido à grande atividade microbicida e capacidade de degradação tecidual (Ohashi et al., 2010).

A ativação alternativa de macrófagos pode ser induzida por citocinas derivadas de células Th2, como por exemplo, IL-4, IL-13 e IL-10. Esses estímulos geram o macrófago reconhecido como alternativamente ativado ou fenótipo M2. Macrófagos gerados por IL-10 são distintamente classificados por M2b e produzem substâncias semelhantes aos M2, porém, em proporções diferentes (Zeyda et al., 2007). Macrófagos M2 expressam preferencialmente os receptores de imunidade inata com especificidade ampla para antígenos, como por exemplo, os receptores de manose (Stein et al., 1992), receptores β -glucanos (Mosser e Handman, 1992), receptores “*scavenger*” tipo 1 e receptores CD163 (Geng e Hansson, 1992; Högger et al., 1998). Apesar de apresentar uma capacidade fagocítica, os macrófagos M2 não exercem funções de extermínio a microorganismos. A produção de NO (Óxido Nítrico) é contrabalanceada pela grande produção de enzima arginase, competindo com NOS (Óxido Nítrico Sintase) pelo substrato L-arginina (Becker e Daniel, 1990). Com isso, macrófagos M2 parecem ser a primeira linha de defesa em situações em que não há a necessidade de uma forte resposta Th1. Em adição, macrófagos M2 exibem uma alta expressão de moléculas MHC classe II, como: HLA-DR e HLA-DQ, indicando que eles são efetivos na apresentação de antígenos (Cua e Stohman, 1997). Com respeito aos receptores de imunoglobulinas, macrófagos M2 não expressam nenhuma das três espécies de receptores Fc γ , o que os torna capazes de induzir diferenciação de células

T indiferenciadas em células T-*helper* antígeno-específicas, presumivelmente as de tipo Th2 e, exercer funções efetoras associadas a respostas Th2 (Cua e Stohlman, 1997).

Macrófagos M2 são encontrados durante o processo de cura das reações da inflamação aguda, em doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide e psoríase e, em tecidos em cicatrização (Goerdts et al., 1993; Szekanecz et al., 1994; Djemadji-Oudjijel et al., 1996). Esta distribuição sugere que estes macrófagos, M2 possam participar na melhora do quadro inflamatório, angiogênese e eliminação de tecidos mortos. Atuam também na melhora do quadro inflamatório, sintetizam e secretam citocinas antiinflamatórias como IL-10 e IL-1ra (Fenton et al., 1992; Schebesch et al., 1997), apresentando uma diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12 e MIP-1 α (Cheung et al., 1990; Standiford et al., 1993; Bonder et al., 1998). Macrófagos M2 são capazes de induzir alto grau de vascularização *in vivo*, além de produzirem fatores angiogênicos *in vitro* como o VEGF (Goerdts et al., 1993; Kodelja et al., 1997). O VEGF é bem descrito na literatura como um importante fator na vasculogênese e angiogênese, e também atua indiretamente na ativação e migração de monócitos, em células neuronais e epiteliais. É um importante fator na expansão tecidual, muito descrito na expansão tumoral e participa também da expansão do tecido adiposo. (Clauss et al., 1990; Yamada et al., 2010). Existem diferentes subtipos de VEGF: VEGF-A, B, C, D e PlGF; dentre estes o VEGF-A, o primeiro a ser descoberto, tem funções importantes atuando na angiogênese, migração e mitose de células endoteliais, no aumento da atividade de metano monooxigenase, vasodilatação, criação de vasos sanguíneos e fenestrações, no aumento da atividade de Integrina- α - β -3v e, por fim, atua como quimiotático de macrófagos e granulócitos (Ferrara, 1999).

O fenótipo dos macrófagos que invadem o tecido adiposo parece mesclar características de M2 e de M1. Zeyda et al., em 2007 demonstraram, ao analisar macrófagos isolados de tecido adiposo comparando-os aos fenótipos gerados *in vitro* (M1 e M2) que estes apresentam marcadores de superfície descritos para macrófagos M2 e M2b, como por exemplo, CD163, CD209 e CD200. Os mesmos autores também avaliaram a expressão de marcadores envolvidos na co-estimulação de células T, que são associados ao fenótipo M1, como, CD40, CD80 e CD86, e estes foram expressos

fracamente por macrófagos isolados do tecido adiposo. A expressão da molécula CD14, não difere entre macrófagos do tecido adiposo e os fenótipos diferenciados *in vitro*. Adicionalmente, foi verificado por Zeyda et al. (2007), que macrófagos do tecido adiposo possuem uma capacidade indiscutível de produzir citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- α , IL-6, IL-1 β , MIP-1 α e MCP-1, mas produzem níveis baixos de RANTES. Produzem ainda altas quantidades de IL-10 e IL-1ra em níveis similares a macrófagos diferenciados como M1.

Acredita-se que a indução da obesidade leva a uma mudança do fenótipo dos macrófagos do tecido adiposo e, esse fenômeno, foi classificado como *switch*, do inglês, mudar. Lumeng et al. (2007) apresentaram duas hipóteses que podem indicar o caminho para entendermos a mudança do fenótipo M2 para M1 observado com a indução da obesidade. Uma das hipóteses é que macrófagos residentes no tecido adiposo com fenótipo M2 sejam transformados de maneira uniforme em macrófagos com fenótipo M1. Outra hipótese baseia-se na premissa de que monócitos pertencentes a subpopulação CCR2⁺Ly6G^{hi}CX3CR1^{low} migrem e se diferenciem em M1 quando em contato com o tecido adiposo, como já é bem descrito para o que ocorre em lesões ateroscleróticas. Embora, estes autores afirmem não dispor de ferramentas para investigar ambas as hipóteses, mas mostraram que em camundongos, macrófagos que habitam os espaços intersticiais entre os adipócitos expressam o marcador característico de M2 lect MGL1/CD301. A introdução da dieta hiperlipídica a estes animais não modifica a presença dos macrófagos MGL1⁺, mas resulta no surgimento de macrófagos MGL1⁻ e polarizados em fenótipo M1 ao redor de adipócitos mortos. O estudo cinético deste evento mostra que a obesidade modifica a taxa de recrutamento destes subtipos de macrófagos, corroborando com a hipótese de que o *switch* M2 para M1 seja decorrente da migração diferencial de macrófagos para o tecido adiposo.

A comunicação entre macrófagos e adipócitos é muito importante e acredita-se que macrófagos M2 encontram-se predominantemente no tecido adiposo de indivíduos magros e atuam de forma a favorecer a formação de novas células deste tecido. A inibição desses processos, realizada pela mudança fenotípica para macrófagos M1, pode promover a hipertrofia e morte dos adipócitos, o que leva à atração de mais monócitos para o tecido adiposo (Strissel et al., 2007). Macrófagos M2 se caracterizam

por ocupar a porção intersticial no tecido adiposo, e a obesidade não altera a localização dessas células no tecido, mas sobrepõe uma nova população de macrófagos com fenótipo M1. Uma diminuição na quantidade de M2 infiltrados no tecido, combinada com o recrutamento de mais monócitos que se diferenciam para um fenótipo mais parecido com M1, altera o equilíbrio de M1/M2 para criar um ambiente mais pró-inflamatório no tecido adiposo (Cancello et al., 2005; Lumeng et al., 2007).

O que se pode afirmar, com certeza, é que o consumo de uma dieta rica em gordura desloca o padrão de produção de citocinas pelos macrófagos do fenótipo M2 para o fenótipo M1, ou seja, no obeso ocorre uma diminuição da produção de IL-10, por exemplo, e um aumento da produção de TNF- α (Zeyda e Stulnig, 2007).

Intervenções durante a infiltração e ativação dos macrófagos no tecido adiposo, são os alvos dos estudos mais recentes sobre obesidade e suas doenças associadas. Determinar como essas intervenções modificam o perfil das células do tecido adiposo, nos levou a investigar o efeito das substâncias produzidas exclusivamente pelas células mais abundantes que compõem esse tecido, os adipócitos sobre a diferenciação de monócitos em macrófagos. Essas substâncias são as adipocitocinas.

1.4. Fatores secretados pelo tecido adiposo: adipocitocinas

Como citado anteriormente, as adipocitocinas influenciam uma variedade de processos fisiológicos. Entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão, a coagulação sanguínea e a modulação de respostas imunes (Fantuzzi e Faggioni, 2000; Godoy-Matos, 2006).

Leptina, do grego *Leptos*, que significa magro. É o produto do gene *ob* encontrado no cromossomo 7 em humanos (Green et al., 1995). Foi descoberta em 1994 por Jeffrey M. Friedman e colaboradores na Universidade de Rockefeller, ao estudar camundongos que eram homozigotos para esse gene (*ob/ob*), apresentando um quadro de obesidade profunda, resultante de defeitos na manutenção da energia e do apetite (Campfield et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Fantuzzi e Faggioni, 2000). Concomitantemente, a deficiência nos genes que controlam a produção de receptores para leptina nas células foi descoberta a partir da identificação da leptina,

sendo este gene conhecido como *db/db* (Zhang et al., 1994). A leptina é principalmente produzida pelos adipócitos, embora outros tecidos, como: o músculo esquelético, placenta, ovários, estômago e fígado também expressam mRNA para leptina (Muio e Lynis, 2002). Classificada como um hormônio pleiotrópico, a leptina está envolvida em diversas funções, tais como regulação de peso, reprodução, função endócrina, bem como em respostas inflamatórias. Receptores de leptina estão presentes no pulmão, intestino, rins, fígado, pele, estômago, coração, baço, dentre outros órgãos (Ahima e Filier, 2000). A leptina age como um sinal aferente de saciedade, atuando sobre o hipotálamo e, regulando o apetite e o peso em humanos e roedores (Koerner et al., 2005).

Diversos estudos sugerem a participação da leptina na linfopoiese e hematopoiese, embora alguns resultados sejam controversos sobre seu papel proliferativo. Gainsford et al. (1996) demonstraram que tanto em células de medula de rato, quanto de humanos a leptina não foi capaz de induzir proliferação, mesmo em combinação com outros fatores (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6, entre outros). Outros estudos apontam a participação da leptina durante a proliferação de células fetais de fígado, medula óssea, células CD34⁺, células estromais, e linhagens megacariocíticas (Bennett et al., 1996; Gainsford et al., 1996; Konopleva et al., 1999).

Esta adipocitocina ainda participa diretamente da produção de diversas citocinas por monócitos e macrófagos. Loffreda et al., (1998) mostrou que macrófagos isolados de camundongos deficientes para leptina produziam quantidades menores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12, bem como apresentavam capacidade reduzida de fagocitose. Quando as culturas eram suplementadas com leptina, estas ações eram revertidas. A leptina ainda é apontada como indutora de aumento na produção de proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (Bouloumié et al., 1999). Além disso, a leptina também induz aumento da produção de IL-1ra, uma citocina que é apontada como antiinflamatória, em linhagens de macrófagos de camundongos, como a RAW 264.7 (Faggioni et al., 1999).

Como citado acima, a leptina possui capacidade de produzir substâncias que atraem monócitos/macrófagos; portanto, é plausível que esta adipocitocina esteja intimamente ligada à infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Estudos mostram que

a leptina participa como uma substância quimiotóxica para neutrófilos (Ottonello et al., 2004), células endoteliais (Goetze et al., 2002), células de músculo liso (Oda et al., 2001) e células de câncer de próstata em homens (Frankenberry et al., 2004), bem como é capaz de induzir quimiotaxia de monócitos/macrófagos paralelo à indução de influxo de Ca^{2+} intracelular. Gruen et al., (2007) realizaram um estudo experimental com células obtidas de camundongos C57BL/6 que possuíam a mutação para o gene *ob* (*ob/ob*) ou seu receptor (*db/db*) em câmara de Boyden, onde determinaram a capacidade quimiotóxica da leptina frente a inibidores (MAPK, PI3K, JAK2, PKC e PLC). Os resultados demonstraram que a ativação de todas as vias, JAK/STAT, MAPK e PI3K é necessária para que a leptina atue como quimiotóxica para monócitos e macrófagos. Também foi avaliada nesse trabalho a capacidade migratória da leptina em comparação com a atividade da MCP-1; os monócitos humanos da linhagem THP-1 migraram em maior quantidade em resposta a MCP-1, do que foi observado para leptina, sugerindo que MCP-1 atua como um quimiotóxico mais potente.

Embora muitas funções da leptina sejam conhecidas, ainda não há relatos precisos se a mesma participa ou interfere no processo de diferenciação de monócitos em macrófagos.

A adiponectina foi descoberta em 1996 por pesquisadores japoneses quando encontraram o gene *apM1* (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). É exclusivamente expressa por adipócitos maduros e classificada como um hormônio que modula processos metabólicos, incluindo regulação da glicemia e catabolismo de ácidos graxos (Maeda et al., 1996; Díez e Iglesias, 2003). A concentração plasmática de adiponectina varia em torno de 5 a 30 mg/ml, correspondendo a aproximadamente 0,01% de proteínas totais do plasma (Arita et al., 1999). Esta concentração é três ordens de grandeza maior, se comparada à maioria de outros hormônios. A relação entre os níveis de adiponectina e da massa corpórea em humanos tem sido muito estudada. Em contraste com a leptina, os níveis de adiponectina são significativamente menores quando se compara indivíduos obesos e indivíduos magros. A adiponectina é a única proteína, especificamente produzida pelo tecido adiposo, que se encontra em níveis diminuídos durante um quadro de obesidade. Arita et al. (1999) demonstraram que os níveis de adiponectina no plasma de um grupo de pacientes obesos eram em

torno de 3,7 mg/ml, enquanto que em um grupo de pacientes não obesos os valores alcançavam 8,9 mg/ml. Outros estudos demonstraram que a adiponectina não está somente diminuída em pacientes obesos, mas também em pacientes com algumas doenças que são freqüentemente associadas com a obesidade, como por exemplo: diabetes melito tipo 2 (Hotta et al., 2000) e doença da artéria coronária (Ouchi et al., 1999).

Evidências recentes sugerem que a perda de peso induz um aumento nos níveis de adiponectina. Em um grupo de 22 pacientes obesos que passaram por cirurgia de redução de estômago, ocorreu um aumento de 46% dos níveis de adiponectina plasmática, acompanhado de 21% de redução do índice de massa corpórea. (Yang et al., 2001). Esses dados sugerem a existência de um *feedback* negativo entre quantidade de tecido adiposo e a produção de adiponectina em humanos.

O único hormônio implicado na regulação da adiponectina é a insulina (Scherer et al., 1995). Estudos recentes demonstraram que o tratamento de uma linhagem de pré-adipócitos, 3T3-L1, com insulina, suprimiu a expressão gênica de adiponectina, diminuindo os níveis de mRNA de maneira dose e tempo dependente (Zhang et al., 2002).

O TNF- α é uma das moléculas mais importantes na causa de resistência a insulina. A expressão e secreção de adiponectina por adipócitos é significativamente reduzida pelo TNF- α (Fasshauer et al., 2002). Portanto, altos níveis de TNF- α podem ser parcialmente responsáveis pela diminuição da produção de adiponectina durante a obesidade. Também é possível que adiponectina por si só aumente a sensibilidade a insulina por uma inibição da produção e ação do TNF- α . Juntos esses dados mostram que esta adipocitocina, classicamente conhecida por seus efeitos antiinflamatórios, participe como supressora de TNF- α e outras substâncias que contribuiriam para doenças relacionadas à obesidade.

Evidências experimentais também sugerem a ação da adiponectina na proteção contra aterosclerose. Baixos níveis dessa adipocitocina tem sido relatados na doença da artéria coronária, bem como associada a fatores de risco de doenças cardiovasculares, como: sexo masculino, hipertensão arterial, obesidade e diabetes melito tipo 2. (Arita et al., 1999; Ouchi et al., 1999; Yamauchi et al., 2001; Kazumi et al.,

2002). Durante as fases iniciais da aterosclerose, os monócitos/macrófagos secretam diversas citocinas e fatores de crescimento que promovem a proliferação de células do músculo liso. Como dito anteriormente, a adiponectina reduz a secreção de TNF- α , inclusive em células como os monócitos e os macrófagos. Monócitos e macrófagos em cultura quando estimulados com adiponectina respondem com diminuição da expressão de genes de receptores *scavenger* (Ouchi et al., 2001). Ela também inibe a expressão intracelular de moléculas de adesão e previne a ligação dos monócitos a células endoteliais aórticas estimuladas por TNF- α . Portanto, esta adipocitocina parece atuar também como um regulador endógeno de células endoteliais em resposta a estímulos inflamatórios (Ouchi et al., 2000).

Todos estes dados sugerem que a adiponectina exerce efeitos antiinflamatórios, antiaterogênicos, especialmente entre células endoteliais e macrófagos, e adicionalmente, participa indiretamente de eventos protetores em modelos experimentais de doenças vasculares, como o processo de aterosclerose. Um trabalho publicado recentemente por Ohashi et al. (2010) mostra que a adiponectina promove a polarização de macrófagos para um fenótipo antiinflamatório, demonstrando que as células obtidas do lavado intraperitoneal de animais *knockout* para adiponectina, eram em sua maioria macrófagos parecidos com os classicamente ativados M1 e com capacidade fagocítica reduzida e, que monócitos humanos diferenciados na presença de adiponectina expressam marcadores M2, como o receptor de manose, IL-10 e CD163, além de produzir quantidades reduzidas de TNF- α e MCP-1.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a possível interferência da leptina e da adiponectina durante o processo de diferenciação e formação do fenótipo final de macrófagos, avaliando a expressão de marcadores de superfície e capacidade de produzir substâncias pró-inflamatórias, antiinflamatórias e quimiotáticas. Pretendemos contribuir para o avanço do conhecimento das interações entre o tecido adiposo e o sistema imunológico, principalmente no processo de diferenciação de monócitos em macrófagos que ocorre no micro-ambiente formado no tecido adiposo.

2. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a influência de fatores produzidos pelo tecido adiposo na diferenciação de monócitos em macrófagos *in vitro*.

Específicos

- Estudar o possível efeito das adipocitocinas: leptina e adiponectina, na diferenciação e formação do fenótipo final de macrófagos *in vitro*, avaliando:
 - a expressão de moléculas de superfície (CD14, CD163, CD36, CD40, CD80, CD86, CD11b, CD200, CD209);
 - a expressão do fator angiogênico: VEGF;
 - a capacidade de produção de citocinas e fatores quimiotáticos: IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra, RANTES, MCP-1 e MIP1- α .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento de monócitos e geração de macrófagos

Monócitos foram obtidos de sangue periférico de voluntários sadios, que não faziam uso de medicamentos e possuíam IMC normal e que consentiram em participar do estudo após o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Protocolo CAAE: 0006.0.142.000-8). Para tanto, um volume de 20 a 40 ml de sangue foi coletado através de punção venosa e transferido para tubos contendo heparina lítica. O sangue foi cuidadosamente pipetado sobre Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB – Björkgatan, Uppsala, Sweden) na proporção 1:1 (v/v) em tubos cônicos (TPP® - Techno Plastic Products AG Zollstrasse, Trasadingen, Switzerland) e, em seguida, centrifugado a 1400 rpm, por 30 minutos, a 22°C. A camada de células mononucleares foi coletada, transferida para um novo tubo e foram adicionados 20 ml de tampão PBS (Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco™ - Grand Island, New York, USA) / BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma Aldric, Co. – Saint Louis, Missouri, USA) / ACD, composto de 85 mM de citrato de sódio, 62.2 mM de ácido cítrico, 110 mM de glicose, diluído em água deionizada, para lavagem do Ficoll-Paque™ Plus. O tubo foi então centrifugado a 1200 rpm, por 10 minutos, a 22 °C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensão em 1 ml de tampão para a contagem em câmara de Neubauer. Em um tubo de polipropileno de 1,5 ml foi colocado 380 µl de Turk, (ácido acético glacial, azul de metileno 5% e água deionizada) e em seguida 20 µl da suspensão celular foi pipetada no tubo e este foi gentilmente agitado. A contagem foi realizada pipetando-se 12,5 µl na câmara de Neubauer montada (com lamínula) e visualizada em objetiva de 10 em microscópio de luz. Após a contagem manual total, acertamos a concentração para 10^7 células/ml e estas foram incubadas, proporcionalmente, com 20 µl/ml de CD14 *MicroBeads human* (MACS® Miltenyi Biotec – Auburn, Califórnia, USA) e 80 µl/ml de tampão PBS/BSA/ACD por 15 min a 4°C. Durante a incubação das células uma coluna MS (MACS® Miltenyi Biotec) foi colocada em campo magnético e lavada com 3 ml de PBS/BSA/ACD para a passagem das células. Após o período de incubação as células foram percoladas através da coluna

MS. Feitas 3 lavagens sucessivas com 1 ml tampão PBS/BSA/ACD, para a retirada de células não-ligadas, a coluna foi retirada do campo magnético e as células CD14⁺ foram eluídas e coletadas em novo tubo de 15 ml. O tubo contendo CD14⁺ foi centrifugado em 1200 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o pellet de CD14⁺ foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2mM de L-glutamina e 25mM tampão HEPES, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 U/ml de penicilina e 10% de soro fetal bovino (meio RPMI), todos da Gibco™ para a segunda contagem. Todos os meios e tampões tinham pH=7,4 e foram filtrados à vácuo por pressão positiva. Durante a segunda contagem, também foi avaliada a viabilidade celular, portanto em outro tubo de polipropileno de 1,5 ml foi colocado 160 µl de PBS/BSA/ACD e 30 µl de Azul de Trifano (Sigma®), em seguida 10 µl da suspensão de CD14⁺. O tubo foi gentilmente agitado e foi feita nova contagem, apenas de células não coradas, ou seja, as células viáveis. Após a segunda contagem e verificada a viabilidade, foi feito o cálculo para a diluição do conteúdo do tubo para 5x10⁵ células/ml, que foram pipetadas em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP®), foram adicionados os estímulos clássicos: IFN-γ 1000U/ml (M1), ou IL-4 10 ng/ml (M2) (Zeyda et al., 2007), por 5 dias em 5 ml de meio de cultura RPMI, gerando macrófagos com fenótipo M1 e M2, respectivamente. Adicionalmente, as células CD14⁺ foram incubadas sob as mesmas condições com leptina 25 ng/ml ou 50 ng/ml e, adiponectina 1 µg/ml ou 2,5 µg/ml, todas de *PeptoTech Inc.*(Rocky Hill, New Jersey, USA).

3.2. Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo

A expressão de marcadores de superfície celular foi avaliada incubando-se 100 µl de suspensão celular após a diferenciação em M1, M2, na presença de leptina 25 e 50 ng/ml ou na presença de adiponectina 1 e 2,5 µg/ml com 5 µl de anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences Pharmigen – San Jose, Califórnia, USA) na combinação mostrada na Tabela 1, por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Após a incubação as células foram lavadas com PBS, centrifugadas por 5

minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em Paraformaldeído 1% para leitura no dia seguinte, por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra e estes foram analisados utilizando o software PAINT-A-GATE™ (BD Biosciences Cell Analysis – San Jose, Califórnia, USA). Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados no Hemocentro da UNICAMP sob supervisão da Profa. Dra. Irene Lorand-Metze.

Tabela 1. Combinação de anticorpos usada na citometria de fluxo.

Composição	
Tubo 1	100µl suspensão celular (branco)
Tubo 2	100µl suspensão celular + CD14PerCP
Tubo 3	100µl suspensão celular + CD14PerCP+CD163PE+CD80FITC
Tubo 4	100µl suspensão celular + CD14PerCP+CD200PE+CD40FITC
Tubo 5	100µl suspensão celular + CD14PerCP+CD86PE+CD209FITC
Tubo 6	100µl suspensão celular + CD14PerCP+CD11bPE+CD36FITC

3.3. Análise da expressão de proteínas por Western Blot

Células diferenciadas conforme descrito anteriormente foram coletadas e homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.6), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinina 0.1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM. Os homogenatos foram centrifugados (12000 rpm, 4°C, 20 min), os sobrenadantes transferidos para tubos contendo tampão de Laemmli com DTT 100 mM e mergulhados em água fervente por 5 minutos para posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separação por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com os anticorpos de interesse (anti-β-Actina, anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc. – Santa Cruz, Califórnia, USA) *overnight* a 4°C antes de serem reveladas com kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Os valores de intensidade óptica obtidos na leitura das

bandas após a incubação com anticorpo anti-VEGF foram corrigidas pela intensidade óptica da leitura das bandas incubadas com o anticorpo anti- β -Actina, pois esta proteína é constitutiva e sua expressão não é alterada em função de intervenções realizadas, podendo deste modo atuar como um fator de correção na análise semi-quantitativa obtida pela técnica de Western blot.

3.4. Ensaio celular de produção de citocinas e quimiocinas

Células já diferenciadas foram transferidas para placas de 96 poços, na concentração de 5×10^5 células por poço e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 , na ausência ou presença de 100 ng/ml de IFN- γ (*PeptoTech Inc.*), 100 ng/ml de LPS (Sigma[®]) e 25 ng/ml de TNF- α (*PeptoTech Inc.*). Após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e utilizado para a quantificação das seguintes citocinas e quimiocinas: TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-1ra, MCP-1, MIP1- α e RANTES utilizando-se Kit comercial de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). O protocolo utilizado para a preparação deste foi o mesmo encontrado no livreto do kit de ELISA.

3.5. Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média (EPM) dos experimentos realizados. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido de pós-teste de Dunnet. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão de moléculas de superfície analisadas por Citometria de Fluxo:

A Tabela 2 mostra a expressão das moléculas de superfície nos macrófagos diferenciados na presença dos estímulos clássicos como o IFN- γ e IL-4 que geram o fenótipo M1 e M2, respectivamente e com os estímulos em análise neste projeto, a leptina e adiponectina em duas concentrações diferentes. Como podemos observar, a expressão de CD14 não foi diferente nas células diferenciadas na presença de IL-4 ou IFN- γ , ou seja, no fenótipo M2 e M1, mas foi significativamente aumentada nas células diferenciadas na presença de adiponectina e leptina em comparação com M1. Não observamos modificações na expressão das moléculas CD200, mas um aumento significativo na expressão de CD209 nas células cultivadas com IL-4, ou seja, o fenótipo M2. Com as adipocitocinas, somente observamos uma expressão aumentada de CD209 nas células diferenciadas com a maior concentração de leptina.

Em nossos experimentos as moléculas CD40 e CD86, relacionadas à estimulação de células T, estão menos expressas no fenótipo M2 em comparação com o fenótipo M1, mas não fomos capazes de observar uma maior expressão de CD80 em M1. Podemos observar que as células cultivadas na presença de leptina e adiponectina apresentaram uma expressão semelhante reduzida de CD40 e CD86, quando comparadas ao fenótipo M1.

A expressão de CD36 e CD163 não foi diferente em nenhuma das situações experimentais. Em relação à expressão de CD11b, as células cultivadas com leptina e adiponectina apresentaram um nível de expressão que não diferiu da expressão observada para M1.

Tabela 2. Expressão das moléculas de superfície em macrófagos diferenciados na presença de IFN- γ (M1), IL-4 (M2), leptina e adiponectina.

Molécula de superfície	M1	M2	LEP 25	LEP 50	ADI 1,0	ADI 2,5
Moléculas de sinalização						
<i>CD 14</i>	55 ± 17	92 ± 26	110 ± 10*	120 ± 20*	168 ± 43*	169 ± 37*
<i>CD200</i>	6 ± 1	5 ± 0	5 ± 0	5 ± 1	8 ± 1	7 ± 0
<i>CD209</i>	5 ± 1	27 ± 8*	4 ± 0	21 ± 11*	6 ± 0	6 ± 1
Receptores scavenger						
<i>CD163</i>	7 ± 2	7 ± 0	10 ± 2	13 ± 3	15 ± 3	14 ± 3
<i>CD36</i>	25 ± 11	34 ± 2	38 ± 9	47 ± 6	44 ± 4	44 ± 7
Co-estimuladores de células T						
<i>CD40</i>	57 ± 7	11 ± 4*	9 ± 2*	29 ± 10	25 ± 6*	16 ± 3*
<i>CD80</i>	6 ± 1	4 ± 0	5 ± 0	11 ± 5	7 ± 0	5 ± 0
<i>CD86</i>	141 ± 22	56 ± 17*	57 ± 21*	83 ± 17*	89 ± 11*	63 ± 10*
Moléculas de adesão						
<i>CD11b</i>	394 ± 151	69 ± 24*	96 ± 43*	293 ± 68	398 ± 109	260 ± 74

Abreviações: M1, células estimuladas com IFN- γ 1000 U/ml; M2, células estimuladas com IL-4 10 ng/ml; LEP 25 e 50, células estimuladas com Leptina 25 e 50 ng/ml; ADI 1,0 e 2,5, células estimuladas com Adiponectina 1,0 e 2,5 μ g/ml. Média das intensidades de fluorescência de cada molécula de superfície representada na forma de média \pm epm (n=4-6). * p<0,05 quando comparado ao fenótipo M1.

4.2. Expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) analisada por Western blot:

A expressão do fator de crescimento endotelial vascular foi verificada por *Western blot*, sendo os resultados apresentados na Figura 1. Podemos verificar um aumento de expressão de VEGF nas células cultivadas com Leptina 25 e 50 ng/ml resultando em valores que se assemelham aos obtidos com células cultivadas com IFN- γ , ou seja, com fenótipo M1. As células cultivadas com IL-4 (fenótipo M2) apresentam valores menores quando comparados às células M1.

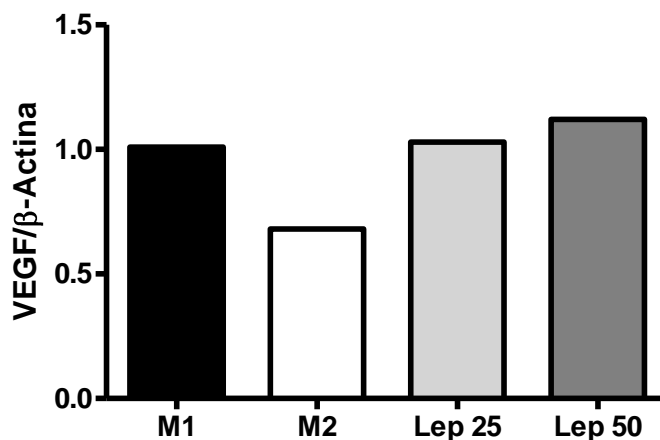
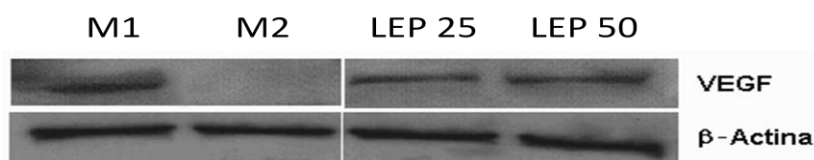


Figura 1. Expressão protéica de VEGF em macrófagos cultivados na presença de IFN- γ 1000U/ml (M1); IL-4 10 ng/ml (M2), Leptina 25 ng/ml (Lep 25) ou Leptina 50ng/ml (Lep 50) por 5 dias. Os painéis acima mostram a imagem obtida com anti-VEGF e anti- β -actina na mesma amostra. Os valores apresentam a quantificação de VEGF corrigido pela quantificação de β -actina de um experimento.

4.3. Produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos

A capacidade de produção de citocinas pelos macrófagos diferenciados foi avaliada após estimulação destas com IFN- γ , LPS e TNF- α . Na Figura 2 podemos observar que a quantidade de TNF- α liberada sem e após os estímulos descritos foi reduzida nas células diferenciadas em M2 quando comparadas às diferenciadas em M1. Esta redução não foi observada nas células diferenciadas na presença de leptina ou adiponectina. Nestes experimentos não foi utilizado o TNF- α como estímulo pois haveria interferências na quantificação da própria citocina no sobrenadante das culturas celulares.

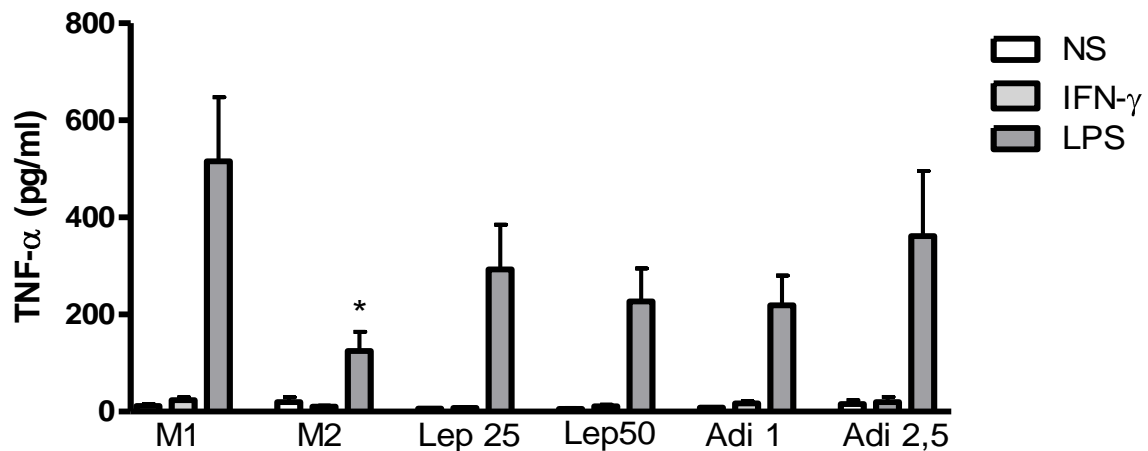


Figura 2. Níveis de TNF- α liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml] (IFN- γ) e LPS [100ng/ml] (LPS). Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 quando comparado a M1.

A Figura 3 mostra-nos que células M2 não estimuladas (NS) produzem menor quantidade de IL-6 e também células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml, adiponectina 1 e 2,5 µg/ml e células M2 estimuladas por IFN-γ e TNF-α apresentam diminuição significativa de IL-6 quando comparadas a células M1 estimuladas pelos mesmos fatores. A produção de IL-6 foi mantida nas células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml, adiponectina 2,5 µg/ml após estimulação com LPS de maneira similar ao observado para M1.

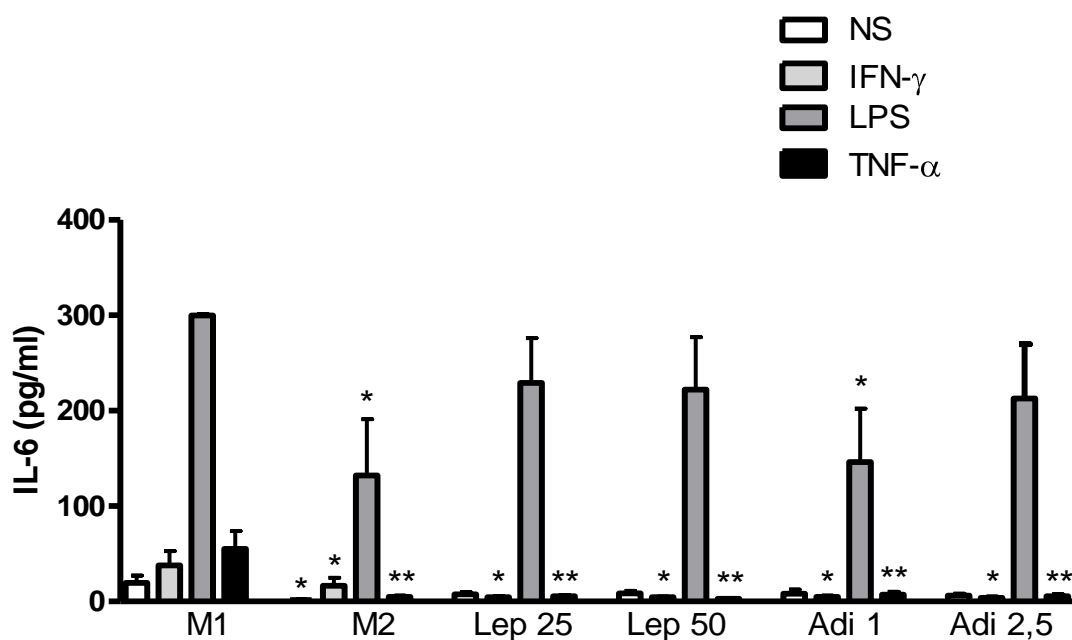


Figura 3. Níveis de IL-6 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN-γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF-α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). * p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado a M1.

Os níveis de IL-1 β liberado por células M2 estimuladas por LPS foi menor quando comparado com células M1, Lep 25, Lep 50, Adi 1 e Adi 2,5. E células diferenciadas por Adi 2,5 foram capazes de produzir IL-1 β , sem estímulo, em maior quantidade quando comparada com os outros tipos de células em estudo (Figura 4).

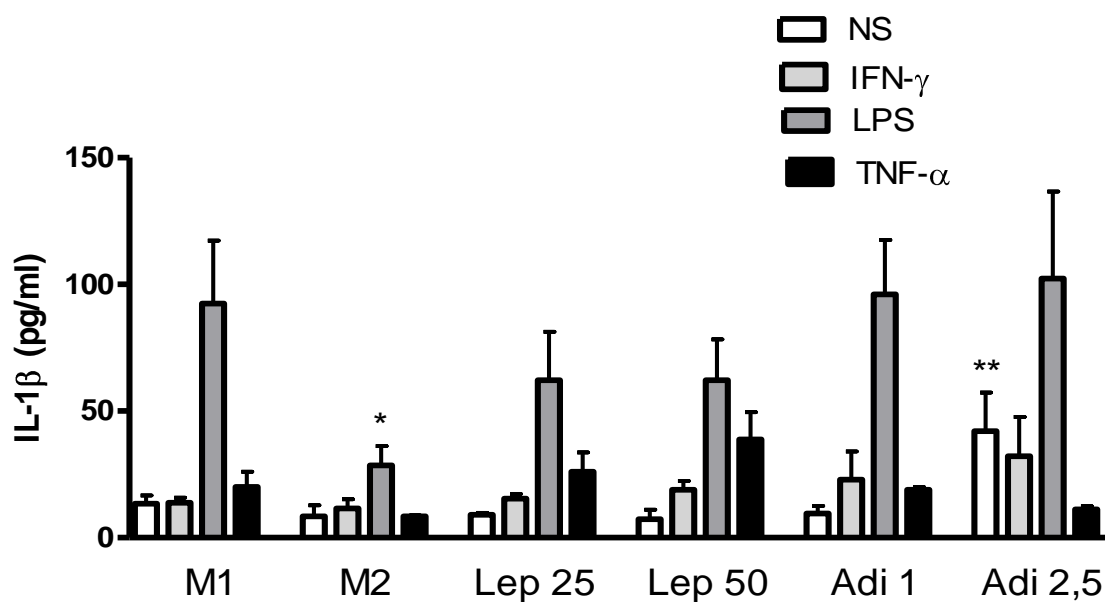


Figura 4. Níveis de IL-1 β liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado a M1.

4.4. Produção de citocinas antiinflamatórias por macrófagos

Podemos observar na Figura 5 que os níveis de IL-1ra diminuem significativamente em células diferenciadas por leptina 25 e 50 ng/ml não estimuladas e estimuladas por TNF- α , quando comparadas com M1, M2 e células diferenciadas na presença de adiponectina 1 e 2,5 μ g/ml.

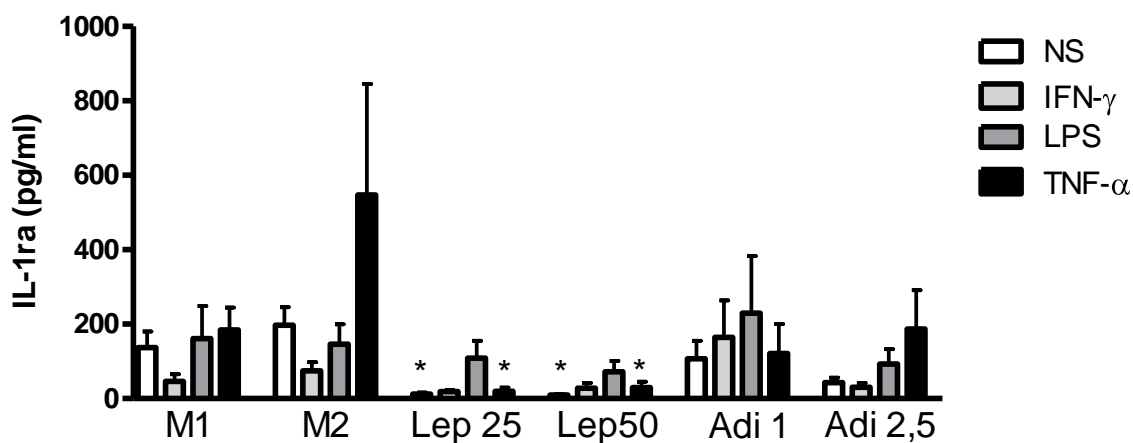


Figura 5. Níveis de IL-1ra liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 quando comparado a M1.

A Figura 6 demonstra a produção de IL-10 pelas células diferenciadas. Pode-se observar que houve aumento apenas nas células diferenciadas por adiponectina na maior dose, estimulada por TNF- α , em comparação com M1. Nos outros tipos celulares não houve diferenças no aumento ou diminuição da produção de IL-10.

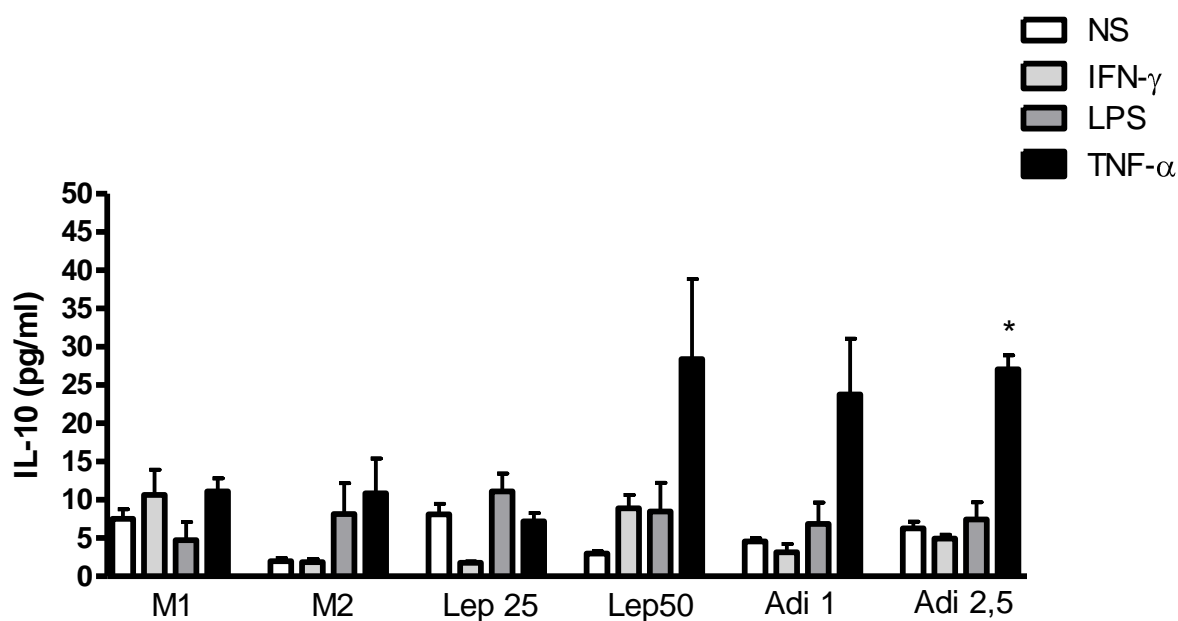


Figura 6. Níveis de IL-10 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4).

4.5. Produção de quimiocinas por macrófagos

Podemos observar na Figura 7 que os níveis de MCP-1 apresentaram-se reduzidos somente nas células M2 quando avaliados os níveis de liberação não-estimulada e estimulada com TNF- α . Nas demais situações a produção de MCP-1 foi mantida em mesmo nível que as células M1.

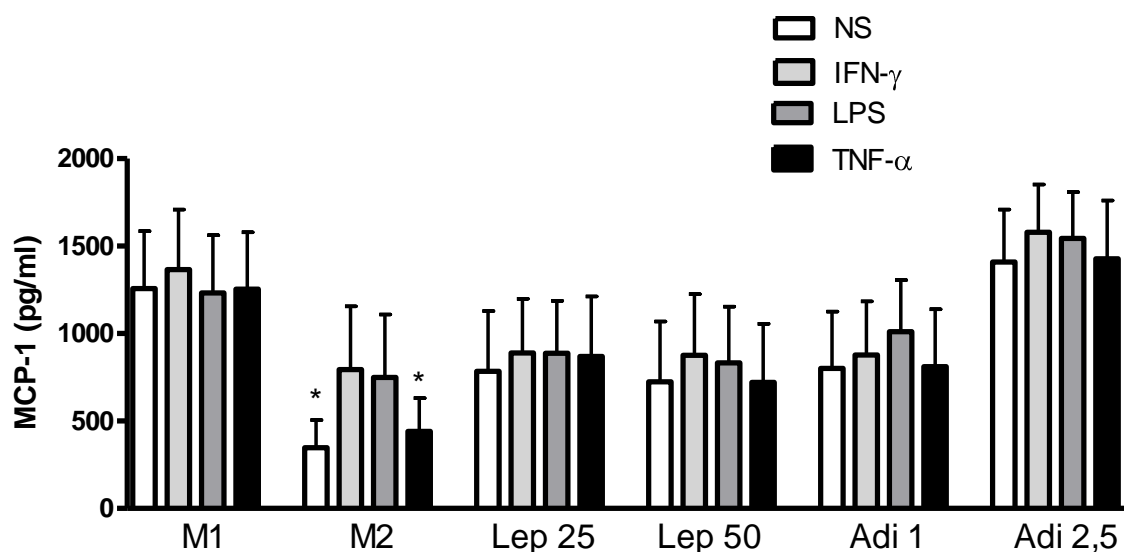


Figura 7. Níveis de MCP-1 liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 quando comparado a M1.

A capacidade de liberação basal de MIP1- α por células diferenciadas com adiponectina 1 $\mu\text{g/ml}$ e leptina 25 ng/ml é significativamente maior quando comparada com os outros tipos celulares. Verificamos que mesmo estimuladas por LPS, as células M2 produzem uma quantidade menor desse fator quimiotático quando comparada com as outras células. (Figura 8).

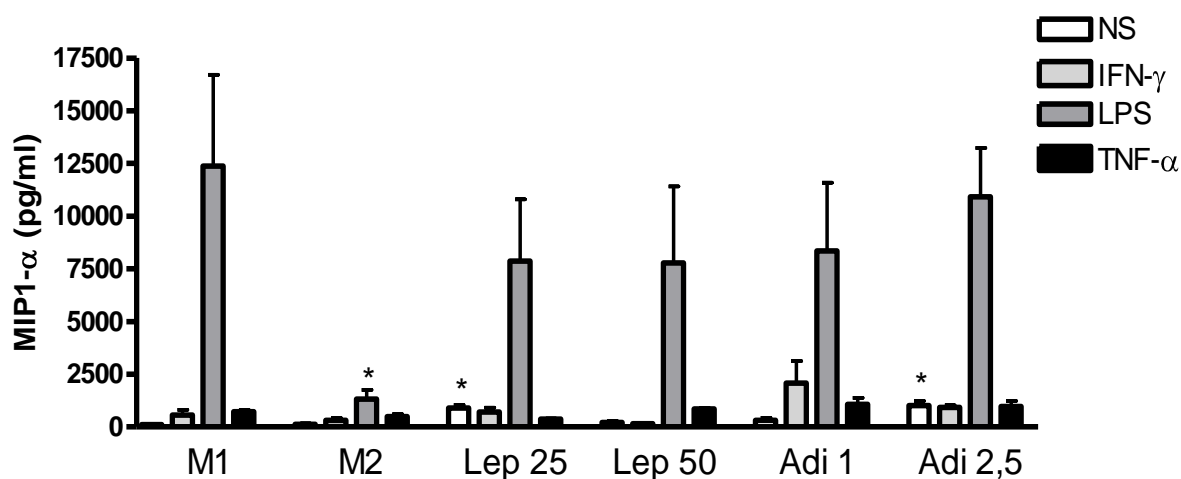


Figura 8. Níveis de MIP1- α liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 quando comparado a M1.

Os níveis basais de RANTES apresentaram-se diminuídos em células diferenciadas com leptina 25 e 50 ng/ml. O mesmo foi observado após estímulo com LPS quando comparadas com M1, como mostra a Figura 9.

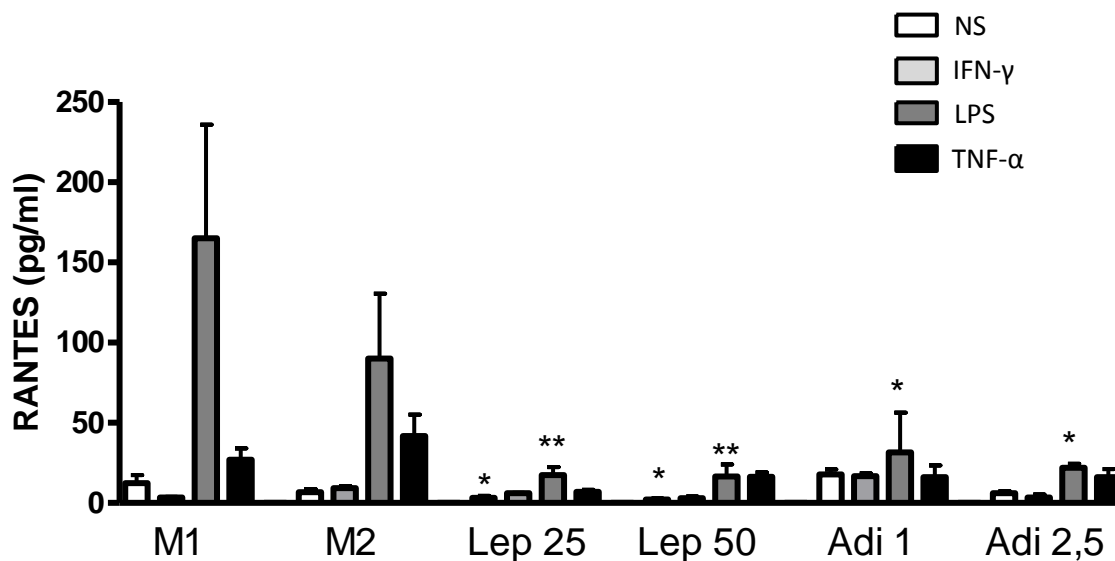


Figura 9. Níveis de RANTES liberados por macrófagos diferenciados *in vitro*, células não-estimuladas (NS); estimuladas com IFN- γ [100ng/ml], LPS [100ng/ml] e TNF- α [25 ng/ml]. Os valores estão apresentados na forma de média acompanhada de erro padrão da média (EPM; n=4). *p<0,05 e ** p<0,01 quando comparado a M1.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, sabe-se que a obesidade está associada a um quadro de inflamação sistêmica leve que predispõe os obesos ao desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes do tipo 2. Estas alterações inflamatórias crônicas estão associadas ao aumento do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo. Estes macrófagos provavelmente interferem com a função do adipócito tornando-se um fator importante para as alterações sistêmicas observadas, como a sensibilidade à insulina (Zeyda e Stulnig, 2007).

Uma fração considerável de monócitos que circulam no sangue periférico é atraída para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos. Acredita-se que o tecido adiposo produza grandes quantidades de quimiocina MCP-1 e esta seja a responsável por recrutar estas células (Deshmane, 2009). Sabe-se também que o fenótipo dos macrófagos presentes no tecido adiposo durante a obesidade apresenta características mistas do fenótipo M1 e do fenótipo M2, provavelmente fruto da ação de várias substâncias liberadas localmente (Bassaganya-Riera et al., 2009). Entretanto, existem poucos relatos de como as adipocitocinas contribuem para este fenótipo final. A fim de caracterizar possíveis diferenças nos fenótipos finais de monócitos cultivados na presença de adiponectina e leptina, analisamos a expressão de vários marcadores de superfície celular utilizando citometria de fluxo. A escolha dos marcadores foi realizada baseada nos relatos de Zeyda et al., (2007) que caracterizaram células diferenciadas na presença de IFN- γ , IL-4 e IL-10, bem como de macrófagos isolados de tecido adiposo. Monócitos e macrófagos, preferencialmente, expressam a molécula CD14. Esta molécula pode se ligar à proteína ligadora do LPS, além de possuir a capacidade de apresentar antígenos expressos por células apoptóticas (Pugin et al., 1993). Pudemos verificar que a expressão de CD14 parece ser maior em macrófagos diferenciados na presença de IFN- γ quando comparado aos diferenciados por IL-4. Monócitos diferenciados por IL-10 (M2b) expressam um número bastante alto de receptores CD14 quando comparado com M1 e este número é maior ainda do que em M2. (Zeyda et al., 2007). Nossos dados não foram capazes de reproduzir o padrão verificado por Zeyda et al., (2007) para M1 e M2. Porém, o mesmo trabalho mostra que macrófagos isolados de tecido adiposo expressaram uma quantidade alta de CD14, também, o que entra em consonância com o observado no presente estudo em macrófagos diferenciados na presença de leptina 25 e 50 ng/ml e, adiponectina 1 e 2,5 μ g/ml, em comparação com M1, sugerindo que a leptina e a adiponectina sejam fatores que interferem na expressão de CD14 pelas células, fazendo com que estas se assemelhem a macrófagos do tecido adiposo.

As moléculas CD40, CD80 e CD86 são características do fenótipo M1 como mencionado anteriormente. Como vimos, a exposição à leptina e adiponectina gerou células que tiveram uma expressão destes marcadores diminuída em comparação com o fenótipo M1. Macrófagos presentes no tecido adiposo não expressam estes

marcadores em níveis altos, sendo essa expressão similar à do fenótipo M2 (Zeyda et al., 2007).

Macrófagos retirados do tecido adiposo expressam CD163, CD209 e CD200 em altas proporções, maiores que em M1 e M2 (Zeyda et al., 2007). Embora CD163 e CD36 sejam ambos receptores *scavenger*, estudos mostram que a expressão destes, difere quanto à origem do macrófago; enquanto CD163 é mais expresso por macrófagos residentes do tecido adiposo, CD36 é expresso nos mesmos níveis, por todos os outros tipos de macrófagos (Zeyda et al., 2007). Sabe-se que 99% das células CD14⁺ expressam CD163 e o tratamento com IL-4 e IL-13 não aumenta esses níveis de expressão (Sulahian et al., 2000). Quando avaliamos a expressão de CD163 e CD36, vimos que não foi possível observar uma variação significativa na expressão desses marcadores nas culturas *in vitro*.

Macrófagos possuem a capacidade de comunicar-se com outros tipos de células do sistema imune, como os neutrófilos, eosinófilos e os mastócitos num contato direto célula-célula. Essa comunicação que regula a atividade destas células é feita através da ligação da proteína de superfície CD200 ao seu receptor CD-200R expresso na maioria das células mielóides (Jenmalm et al., 2006). A expressão de CD200 é maior em células M2 e maior ainda em macrófagos do tecido adiposo. Os resultados deste trabalho mostram que a expressão de CD200 pelas células cultivadas com leptina e com adiponectina, nas duas concentrações, e células M2 e M1 não apresentaram diferenças significativas. Estudos mostram que linhagens celulares mielóides de baço e macrófagos CD11b⁺ não expressam CD200, e como pudemos verificar, os níveis de expressão de CD11b em todas as culturas foram maiores quando comparados com os níveis de CD200 (Hoeck et al., 2000). Também verificamos a expressão de CD209, denominada por vezes como o receptor de lectina tipo-C, presente em fagócitos e cuja principal função é capturar antígenos. Alguns destes receptores parecem ter um papel mais importante na ativação celular do que na internalização de antígenos (Robinson et al., 2006). A expressão deste marcador foi maior em macrófagos M2 e nas células diferenciadas apenas com a maior dose de leptina.

E, finalmente, a molécula CD11b, também conhecida como integrina alpha M (α M β 2), antígeno-1 do macrófago (Mac-1) e receptor complemento 3 (CR3) é expressa

em monócitos, granulócitos, macrófagos e células natural killer. Embora, na Tabela 2 esteja designada como uma molécula de adesão ela possui diversas funções, como por exemplo: na fagocitose, quimiotaxia e ativação celular (Solovjov et al., 2004). Nossos resultados sugerem um aumento da expressão de CD11b quando comparamos M1 a M2. Macrófagos de tecido adiposo expressam níveis de CD11b intermediários, entre M1 e M2, sendo que macrófagos M2 apresentam um número maior em comparação com os outros fenótipos de macrófagos. O fenótipo M2b expressa CD11b em menor quantidade em comparação com os outros fenótipos (Zeyda et al., 2007). Observamos com nossos resultados que houve uma redução na expressão dessa molécula de superfície pelos macrófagos M2 e em leptina 25 ng/ml, entretanto, *in vitro*, os macrófagos diferenciados por adiponectina nas duas doses e leptina 50 ng/ml, expressaram CD11b em níveis similares a M1.

Além dos macrófagos desempenharem um papel importante na manutenção da inflamação produzindo citocinas pró- e antiinflamatórias e seqüestrando restos celulares e de bactérias, eles também produzem fatores que contribuem para a expansão do tecido adiposo, como os relacionados à angiogênese, por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Mosser, 2003; Kamada et al., 2008). Baseados nessa informação investigamos também a expressão de VEGF nas células diferenciadas *in vitro* e notamos que as culturas mantidas com o estímulo leptina 25 e 50 ng/ml, a expressão protéica de VEGF foi igual à mantida na presença de IFN- γ , ou seja, macrófagos M1. Nota-se, claramente, que células mantidas na presença de IL-4, ou macrófagos M2, expressam menos VEGF. Relatos de literatura descrevem a ação angiogênica da leptina envolvendo a modificação da atividade de metaloproteases e de seus inibidores, e que esta atua de maneira sinérgica com fatores angiogênicos como o VEGF (Park et al., 2001; Cao et al., 2001). Park et al., (2001) também demonstraram que a leptina foi capaz de induzir uma maior produção de VEGF em células endoteliais em cultura. Nossos resultados indicam que a leptina também é capaz de aumentar a produção de VEGF em macrófagos, o que poderia contribuir ainda mais para a produção de fatores angiogênicos pelo tecido adiposo que contribuirão para a sua expansão.

A produção de citocinas pelas células já diferenciadas foi quantificada pelo método de ensaio imunoenzimático, um ensaio de captura do antígeno empregado para detectar produtos secretados (Janeway et al., 2006). A escolha das citocinas e quimiocinas a serem testadas foi baseada em Zeyda et al., 2007.

Após a diferenciação, as células foram submetidas à cultura de curto prazo para avaliação da liberação basal das citocinas e frente a estímulos como o IFN- γ , LPS e TNF- α . Macrófagos estimulados com interferon gama (IFN)- γ isoladamente ou combinado a lipopolissacarídeos (LPS) produzem citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α e são denominados M1 (Gordon, 2003). Como dito anteriormente, sabemos que a obesidade está associada com a infiltração de macrófagos no tecido adiposo resultando em um processo inflamatório local (Wellen e Hotamisligil, 2003). Esta interação leva à produção de diversas citocinas e quimiocinas como o TNF- α (Hotamisligil et al., 1993), IL-6 (Fried et al., 1998), IL-1 β , IL-10, IL-1ra (Dayer et al., 2006), MCP-1 (Sartipy e Loskutoff, 2003), MIP1- α e RANTES, que podem ativar, propagar e sustentar a resposta inflamatória no tecido adiposo (Zeyda e Stulning, 2007). Durante o processo inflamatório no tecido adiposo, todos os tipos celulares, dos quais ele é composto são ativados, incluindo os linfócitos T. Neste caso, linfócitos Th1 contribuem produzindo citocinas Th1 como o IFN- γ . Uma das citocinas quantificada no presente trabalho foi o TNF- α , classificado como uma citocina pró-inflamatória tem sido muito estudada devido a seus efeitos sobre a regulação de diferenciação de adipócitos, metabolismo de lipídeos, e sensibilidade à insulina (Hotamisligil et al., 1995; Uysal et al., 1997). Os níveis de TNF- α estão positivamente relacionados à resistência à insulina e a fatores que elevam o risco de doenças cardiovasculares (You et al., 2005). O TNF- α é produzido por adipócitos, monócitos e macrófagos; análises de populações isoladas de células do tecido adiposo indicam que os macrófagos são responsáveis pela maioria do TNF- α encontrado no tecido adiposo. (Weisberg et al., 2003). Entretanto, em camundongos magros, são os adipócitos os maiores responsáveis pela produção de TNF- α . (Clément et al., 2004). Os estudos *in vitro*, com linhagens celulares de humanos e de animais, reproduzem bem os modelos *in vivo*, demonstrando que o TNF- α é uma citocina envolvida no processo inflamatório durante a obesidade e sua produção pelo tecido adiposo contribui de maneira significativa para o estabelecimento de doenças associadas à obesidade.

O IFN- γ e o TNF- α , são substâncias endógenas, ou seja, são produzidas pelas células de nosso próprio organismo, porém, sua liberação quase sempre está ligada à ativação da célula que a sintetiza. Um estímulo clássico muito utilizado para demonstrar a ativação de células que possuem receptores do tipo-Toll-4 (*Toll-like receptors*, TLR), como os macrófagos, por exemplo, é o LPS, um componente da parede externa de bactérias Gram negativas (Roitt et al., 2001). Os TLR-4 e os TLR-2 são encontrados também em adipócitos maduros, e estes podem ser ativados por LPS e liberar grandes quantidades de TNF- α (Bès-Houtmann et al., 2007).

Verificamos se haveria diferença na produção de citocinas pelas células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml e adiponectina 1 e 2,5 μ g/ml em comparação com células do fenótipo M1 e M2, frente aos estímulos discutidos anteriormente. Primeiramente avaliamos a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células diferenciadas com os diversos fatores. Pudemos observar que houve uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α produzidos por células M2 estimulados por LPS e

não estimuladas. Isso indica que, naturalmente, células M2 produzem menos TNF- α em comparação com células M1. Essa baixa produção não foi observada em células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml e adiponectina 1 e 2,5 μ g/ml, sugerindo que estas se assemelham mais a M1 nessas condições. Vimos também a partir dos resultados, que a produção de IL-6 por células M2 não estimuladas é menor em comparação com células M1. Células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml e adiponectina 1 e 2,5 μ g/ml e as M2 estimuladas por IFN- γ e TNF- α apresentam diminuição significativa de IL-6 quando comparadas às células M1 estimuladas pelos mesmos fatores. Estes resultados se assemelham com o observado para células que são classificadas em fenótipos antiinflamatórios, ou seja, produção diminuída de fatores pró-inflamatórios (Fenton et al., 1992). No entanto, a produção de IL-6 foi mantida nas células diferenciadas na presença de leptina 25 e 50 ng/ml e adiponectina 2,5 μ g/ml após estimulação com LPS. Zeyda et al, (2007) sugerem que macrófagos do tecido adiposo liberam grandes quantidades de IL-6 quando comparados a M2, porém células M1 estimuladas por LPS liberam mais IL-6 quando comparadas aos macrófagos obtidos de tecido adiposo. A IL-6 é uma proteína produzida por células T, monócitos/macrófagos, fibroblastos, hepatócitos, células do endotélio vascular, entre outras. Sua produção é regulada a partir de estímulos como LPS, IL-1 β e TNF- α (Kishimoto et al., 1992). Esta interleucina participa como mediadora de respostas inflamatórias e imunes iniciadas por infecções ou dano tecidual, é está associada à diversas doenças, como artrite (Wendling et al., 1993), psoríase (Grossman et al., 1989), doenças inflamatórias intestinais (Hyams et al., 1993), mielomas, linfomas e leucemias (Dunbar e Nienhuis, 1993; Kurzrock et al., 1993).

A IL-1 β , que também é uma citocina pró-inflamatória, com importantes funções na inflamação crônica e aguda, é produzida por monócitos e macrófagos. A IL-1 β induz secreção de IFN- γ por células NK, resultando em ativação de macrófagos pelo IFN- γ (Billiau, 1996). Ao observarmos nossos resultados, vimos que IL-1 β foi liberada em menor quantidade por M2, quando estimuladas por LPS, porém, vimos um aumento na produção de IL-1 β por células que não receberam nenhum tipo de estímulo, diferenciadas por adiponectina 2,5 μ g/ml. Quando comparamos as células diferenciadas por leptina e adiponectina estimuladas por LPS, IFN- γ e TNF- α , com células M1, vimos que não há diferenças entre os tipos celulares. Zeyda et al. (2007), observaram que macrófagos do tecido adiposo produzem uma quantidade maior de IL-1 β , quando comparados com macrófagos M1, já em M2 os níveis foram muito baixos em relação aos dois tipos de células analisadas. Reproduzindo os resultados descritos para M2. Os níveis de IL-1 β observados para as células diferenciadas com adiponectina e leptina sugerem uma semelhança aos macrófagos do tecido adiposo.

A fim de avaliar a liberação *in vitro* de citocinas antiinflamatórias pelos diferentes tipos de células geradas, avaliamos a IL-10 e IL-1ra, que são conhecidas por serem citocinas liberadas por células com fenótipo antiinflamatório. IL-1ra é o antagonista do receptor de IL-1, não atua como um sinal para início de transdução de nenhuma proteína. Aparece em fases da inflamação aguda a fim de diminuir seus efeitos (Cominelli e Pizarro, 1997; Nicklin et al., 2002). É inicialmente produzido por monócitos em resposta a diversos estímulos e atua bloqueando a ação da IL-1, competindo pelo seu sítio de ligação e inibindo a síntese substâncias que participam de inúmeros eventos pró-inflamatórios (Arend, 2002). A produção de IL-1ra nas células diferenciadas na presença de leptina é baixa. Macrófagos do tecido adiposo liberam quantidades similares de IL-1ra quando estimulados por LPS em comparação com

macrófagos M1 (Zeyda et al., 2007). Macrófagos M2 quando estimulados por IFN- γ , LPS ou TNF- α liberam uma quantidade maior desta interleucina antiinflamatória. Visto que a leptina é uma citocina pró-inflamatória e que esta exibe esse comportamento *in vitro*, inibindo a liberação de citocinas antiinflamatórias, como a IL-1ra, podemos ressaltar mais uma vez a semelhança entre os macrófagos encontrados no tecido adiposo àqueles diferenciados na presença de fatores produzidos pelo tecido adiposo.

Os níveis de IL-10 não foram diferentes entre os tipos celulares, com exceção das células diferenciadas por adiponectina 2,5 $\mu\text{g/ml}$ estimuladas por TNF- α , em comparação com células M1. Estes resultados estão em contraste com os dados de Zeyda et al. (2007), que verificaram uma grande diferença nos níveis de IL-10 liberados por células obtidas do tecido adiposo em comparação com os outros fenótipos. A IL-10 foi primeiramente identificada em 1989 como a citocina inibidora de síntese, produzida por vários tipos de células incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T, células B, células dendríticas e mastócitos, muitas destas encontradas nos tecidos linfóides secundários. Esta interleucina é uma citocina regulatória que inibe a apresentação de antígeno e a subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas da família da IL-10, incluindo IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29, estão envolvidas na regulação das respostas imunes e inflamatórias (Li e He, 2004).

As quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos; são citocinas quimiotáticas, além de estimular a produção de novas citocinas e auxiliar na diferenciação celular. As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos ou células residentes do local da inflamação, em resposta a estímulos externos (Abbas e Lichtman, 2005). Dentre as citocinas que promovem a quimiotaxia de monócitos para o tecido adiposo podemos citar RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 e MIP-1 α /CCL3.

RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted*) é um potente quimioatrativo de vários tipos celulares incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺ (Schall et al., 1990), células NK (Loetscher et al., 1996), basófilos (Bischoff et

al., 1993), eosinófilos (Kameyoshi et al., 1992), células dendríticas (Lin et al., 1998), mastócitos (Mattoli et al., 1995), monócitos (Fine et al., 2001) e microglia (Cross e Woodroffe, 1999). Esta quimiocina interage com as células via receptores transmembrana acoplados à proteína G: CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5 (Combadiere et al., 1996). Os níveis de RANTES observados foram menores em células diferenciadas com leptina 25 e 50 ng/ml e adiponectina 1 e 2,5 µg/ml quando comparadas a M1 e M2. Os resultados apresentados em Zeyda et al. (2007) demonstram que macrófagos do tecido adiposo secretam RANTES em níveis baixos em comparação com macrófagos M1 e M2, mais uma vez sugerindo que células diferenciadas na presença dos fatores produzidos pelo tecido adiposo adquirem fenótipo semelhante aos encontrados no tecido adiposo.

MCP-1 ou CCL2 é conhecida pela habilidade de atuar como uma potente substância quimiotática e ativadora de monócitos/macrófagos (Gu et al., 1999; Jiang et al., 1992). Outros tipos celulares respondem a MCP-1 incluindo células NK, Células T, eosinófilos e basófilos (Carr et al., 1994; Loetscher et al., 1996; Marra et al., 1999; Heinemann et al., 2000; Dunzendorfer et al., 2001). Esta quimiocina é induzida por mediadores inflamatórios como LPS, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 (Rollins e Pober, 1991; Zhu et al., 1994; Gautam et al., 1995; Kitamura et al., 1997; Loghmani et al., 2002). Como é comum para quimiocinas, a MCP-1 também divide o seu receptor CCR2 com diversos outros ligantes, como MCP-2, 3 e 4. Diversos experimentos com animais sugerem que MCP-1 tem importantes papéis nos processos inflamatórios. Sua alta expressão aumenta o recrutamento de monócitos e linfócitos também *in vivo* (Rand et al., 1996; Zisman et al., 1997). Alguns estudos em animais *knockouts* para o gene que codifica MCP-1 demonstram supressão de macrófagos relacionados à inflamação, monócitos, células NK, células NKT, e infiltração de células $\gamma\delta$ T (Kawakami et al., 2001; Low et al., 2001). Em nossos resultados, vimos que os níveis de MCP-1 apresentaram-se reduzidos somente nas células M2. Em macrófagos do tecido adiposo é possível observar altos níveis de MCP-1, condizente com o que se observou em nossas culturas.

MIP-1 α é uma quimiocina que atrai monócitos, produzida por células T ativadas, monócitos, mastócitos, neutrófilos, células de Langerhans, astrócitos, células

endoteliais, fibroblastos e células de músculo liso (Parkinson et al., 1993; Kasama et al., 1994; Koch et al., 1994; Lukacs et al., 1994; Kelner e Zlotnik, 1995). Dentre suas funções, também tem sido relatados efeitos pró-adesão sobre linfócitos T (Tanaka et al., 1993), células NK (Taub et al., 1995), células T citotóxicas, células B (Schall et al., 1993), basófilos (Alam et al., 1992), e eosinófilos (Rot et al., 1992). De acordo com nossos resultados a capacidade de produção de MIP-1 α aumentou nas células diferenciadas na presença de adiponectina 1 μ g/ml e leptina 25 ng/ml. De forma semelhante o trabalho realizado por Zeyda et al., em 2007, demonstrou que macrófagos M1 e M2 produzem menor quantidade de MIP-1 α em uma condição sem estímulo e estimulados por IFN- γ , em comparação com macrófagos do tecido adiposo.

Podemos então apontar a importante participação da leptina na diferenciação de monócitos em macrófagos *in vitro*, de acordo com as análises dos marcadores de superfície, como: CD14, CD209, CD40, CD86 e CD11b. A avaliação da produção de citocinas por estas células pode ser correlacionada com macrófagos do tecido adiposo e macrófagos do tipo M1, principalmente durante a liberação basal e estimulada por LPS. A diferenciação por adiponectina nas duas doses, nos mostrou que, embora esta seja uma adipocitocina considerada antiinflamatória, seus efeitos durante a diferenciação de monócitos em macrófagos também geraram células com um perfil semelhante aos macrófagos do tecido adiposo, tanto pela expressão de marcadores de superfície: CD14, CD40 e CD86, quanto pela produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir com base em nossos resultados que a exposição dos monócitos a leptina e adiponectina resulta em macrófagos com fenótipo mais próximo ao descrito para macrófagos do tecido adiposo, ou seja, expressando marcadores de superfície característicos, capazes de contribuir para a expansão do tecido adiposo e aptos a produzirem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, em detrimento da produção de citocinas antiinflamatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; **2005**.

Ahima, R. S.; Flier, J. S. Leptin. **Annu Rev Physiol**, 62:413-37, 2000.

Alam, R.; Forsythe, P. A.; Stafford, S.; Lett-Brown, M. A.; Grant, J. A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. **J Exp Med**, 176(3):781-6, 1992.

Arend, W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, 13(4-5):323-40, 2002.

Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; Kuriyama, H.; Nishida, M.; Yamashita, S.; Okubo, K.; Matsubara, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, 257(1):79-83, 1999.

Aron-Wisnewsky, J.; Tordjman, J.; Poitou, C.; Darakhshan, F.; Hugol, D.; Basdevant, A.; Aissat, A.; Guerre-Millo, M.; Clément, K. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, 94(11):4619-23, 2009.

Bassaganya-Riera, J.; Misyak, S.; Guri, A.J.; Hontecillas, R. PPAR gamma is highly expressed in F4/80(hi) adipose tissue macrophages and dampens adipose-tissue inflammation. **Cell Immunol**, 258(2):138-46, 2009.

Becker, S.; Daniel, E. G. Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. **Cell Immunol**, 129(2):351-62, 1990.

Bennett, B. D.; Solar, G. P.; Yuan, J. Q.; Mathias, J.; Thomas, G. R.; Matthews, W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. **Curr Biol**, 1170-1180, 1996.

Bès-Houtmann, S.; Roche, R.; Hoareau, L.; Gonthier, M. P.; Festy, F.; Caillens, H.; Gasque, P.; Lefebvre d'Hellencourt, C.; Cesari, M. Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. **Histochem Cell Biol**, 127(2):131-7, 2007.

Billiau, A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. **Adv Immunol**, 62:61-130, 1996.

Bischoff, S. C.; Krieger, M.; Brunner, T.; Rot, A.; von Tscharner, V.; Baggiolini, M.; Dahinden, C. A. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. **Eur J Immunol**, 23(3):761-7, 1993.

Bonder, C. S.; Dickensheets, H. L.; Finlay-Jones, J. J.; Donnelly, R. P.; Hart, P. H. Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. **J Immunol**, 160(8):4048-56, 1998.

Bornstein, S. R.; Abu-Asab, M.; Glasow, A.; P ath, G.; Hauner, H.; Tsokos, M.; Chrousos, G. P.; Scherbaum, W. A. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. **Diabetes**, 49(4):532-8, 2000.

Bouloumie, A.; Marumo, T.; Lafontan, M.; Busse, R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. **FASEB J**, 13, 1231–1238, 1999.

Campfield, L. A.; Smith, F. J.; Guisez, Y.; Devos, R.; Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, 269(5223):546-9, 1995.

Canello, R.; Henegar, C.; Viguerie, N.; Taleb, S.; Poitou, C.; Rouault, C.; Coupaye, M.; Pelloux, V.; Hugol, D.; Bouillot, J. L.; Bouloumié, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S.; Svensson, P. A.; Barsh, G. S.; Zucker, J. D.; Basdevant, A.; Langin, D.; Clément, K.; Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, 54(8):2277-86, 2005.

Cao, R.; Brakenhielm, E.; Wahlestedt, C.; Thyberg, J.; Cao, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98(11):6390-5, 2001.

Carr, M. W.; Roth, S.J.; Luther, E.; Rose, S. S.; Springer, T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91(9):3652-6, 1994.

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

Cheung, D.L.; Hart, P.H.; Vitti, G.F.; Whitty, G.A.; Hamilton, J.A. Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. **Immunology**, 71(1):70-5, 1990.

Clauss, M.; Gerlach, M.; Gerlach, H.; Brett, J.; Wang, F.; Familletti, P.C.; Pan, Y.C.; Olander, J.V.; Connolly, D.T.; Stern, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. **J Exp Med**, 172(6):1535-45, 1990.

Clément, K.; Viguerie, N.; Poitou, C.; Carette, C.; Pelloux, V.; Curat, C.A.; Sicard, A.; Rome, S.; Benis, A.; Zucker, J.D.; Vidal, H.; Laville, M.; Barsh, G.S.; Basdevant, A.; Stich, V.; Canello, R.; Langin, D. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. **FASEB J**, 18(14):1657-69, 2004.

Combadiere, C.; Ahuja, S.K.; Tiffany, H.L.; Murphy, P.M. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. **J Leukoc Biol**, 60(1):147-52, 1996.

Cominelli, F.; Pizarro, T.T. Interleukin-1 receptor antagonist: a "novel" acute phase protein with antiinflammatory activities. **J Clin Invest**, 99(12):2813, 1997.

Cross, A.K.; Woodrooffe, M.N. Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro. **J Neurosci Res**, 55(1):17-23, 1999.

Cua, D.J.; Stohlman, S.A. In vivo effects of T helper cell type 2 cytokines on macrophage antigen-presenting cell induction of T helper subsets. **J Immunol**, 159(12):5834-40, 1997.

Curat, C.A.; Miranville, A.; Sengenès, C.; Diehl, M.; Tonus, C.; Busse, R.; Bouloumié, A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. **Diabetes**, 53(5):1285-92, 2004.

Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, 8(12): 958–969, 2008.

Dayer, J.M.; Chicheportiche, R.; Juge-Aubry, C.; Meier, C. Adipose tissue has anti-inflammatory properties: focus on IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). **Ann N Y Acad Sci**, 1069:444-53, 2006.

Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, 29(6):313-26, 2009.

Dunbar, C.E.; Nienhuis, A.W. Multiple myeloma. New approaches to therapy. **JAMA**, 269(18):2412-6, 1993.

Dunzendorfer, S.; Kaneider, N.C.; Kaser, A.; Woell, E.; Frade, J.M.; Mellado, M.; Martínez-Alonso, C.; Wiedermann, C.J. Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, 108(4):581-7, 2001.

Dupasquier, M.; Stoitzner, P.; Wan, H.; Cerqueira, D.; van Oudenaren, A.; Voerman, J.S.; Denda-Nagai, K.; Irimura, T.; Raes, G.; Romani, N.; Leenen, P.J. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling. **J Leukoc Biol**, 80(4):838-49, 2006.

Djemadji-Oudjil, N.; Goerdts, S.; Kodolja, V.; Schmuth, M.; Orfanos, C.E. Immunohistochemical identification of type II alternatively activated dendritic macrophages (RM 3/1+3, MS-1+/-, 25F9-) in psoriatic dermis. **Arch Dermatol Res**, 288(12):757-64, 1996.

Elgazar-Carmon, V.; Rudich, A.; Hadad, N.; Levy, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **J Lipid Res**, 49(9):1894-903, 2008.

- Faggioni, R., Fuller, J., Moser, A., Feingold, K. R., Grunfeld, C. LPS-induced anorexia in leptin deficient (*ob/ob*) and leptin receptor deficient (*db/db*) mice. **Am J Physiol**, 273, R181–R186, 1997.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M & Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1084–1089, 2002.
- Fantuzzi, G. J. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Allergy Clin Immunol**, 115(5):911-9, 2005.
- Fantuzzi, G.; Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **J Leukoc Biol**, 68(4):437-46, 2000.
- Fenton, M.J.; Buras, J.A.; Donnelly, R.P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. **J Immunol**, 149(4):1283-8, 1992.
- Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney Int**, 56(3):794-814, 1999.
- Fine, J.S.; Byrnes, H.D.; Zavodny, P.J.; Hipkin, R.W. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. **Inflammation**, 25(2):61-7, 2001.
- Frankenberry, K.A.; Somasundar, P.; McFadden, D.W.; Vona-Davis, L.C. Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. **Am J Surg**, 188: 560–565, 2004.
- Fried, S.K.; Bunkin, D.A.; Greenberg, A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrinol Metab**, 83(3):847-50, 1998.
- Gainsford, T.; Willson, T.A.; Metcalf, D.; Handman, E.; McFarlane, C.; Nicola, N.A.; Alexander, W.S.; Hilton, D.J. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93(25):14564-8, 1996.
- Gambero, A.; Maróstica, M.; Abdalla Saad, M.J.; Pedrazzoli, J.Jr. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. **Inflamm Bowel Dis**, 13(11):1357-64, 2007.
- Gautam, S.C.; Noth, C.J.; Janakiraman, N.; Pindolia, K.R.; Chapman, R.A. Induction of chemokine mRNA in bone marrow stromal cells: modulation by TGF-beta 1 and IL-4. **Exp Hematol**, 23(6):482-91, 1995.
- Geng, Y.J.; Hansson, G.K. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. **J Clin Invest**, 89(4):1322-30, 1992.
- Godoy-Matos, A.F. Síndrome metabólica. São Paulo: **Atheneu**, 2006;

Goerdt, S.; Bhardwaj, R.; Sorg, C. Inducible expression of MS-1 high-molecular-weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cells/macrophages in vivo and in vitro. **Am J Pathol**, 142(5):1409-22, 1993.

Goetze, S.; Bungenstock, A.; Czupalla, C.; Eilers, F.; Stawowy, P.; Kintscher, U.; Spencer-Hansch, C.; Graf, K.; Nurnberg, B.; Law, R.E.; Fleck, E.; Grafe, M. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. **Hypertension**, 40: 748–754, 2002.

Gordon, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, 3(1):23-35, 2003.

Gordon, S. The macrophage. **Bioessays**, 17(11):977-86, 1995.

Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC Jr, Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. **Genome Res**, 5(1):5-12, 1995.

Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; Sul, H.S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiol Rev**, 78(3):783-809, 1998.

Grossman, R.M.; Krueger, J.; Yourish, D.; Granelli-Piperno, A.; Murphy, D.P.; May, L.T.; Kupper, T.S.; Sehgal, P.B.; Gottlieb, A.B. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 86(16):6367-71, 1989.

Gruen, M.L.; Hao, M; Piston, D.W.; Hasty, A.H. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. **Am J Physiol Cell Physiol**, 293: C1481–C1488, 2007.

Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. **Chem Immunol**, 72:7-29, 1999.

Heinemann, A.; Hartnell, A.; Stubbs, V.E.; Murakami, K.; Soler, D.; LaRosa, G.; Askenase, P.W.; Williams, T.J.; Sabroe, I. Basophil responses to chemokines are regulated by both sequential and cooperative receptor signaling. **J Immunol**, 165(12):7224-33, 2000.

Hoek, R.M.; Ruuls, S.R.; Murphy, C.A.; Wright, G.J.; Goddard, R.; Zurawski, S.M.; Blom, B.; Homola, M.E.; Streit, W.J.; Brown, M.H.; Barclay, A.N.; Sedgwick, J.D. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). **Science**, 290(5497):1768-71, 2000.

Högger, P.; Dreier, J.; Droste, A.; Buck, F.; Sorg, C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). **J Immunol**, 161(4):1883-90, 1998.

Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259(5091):87-91, 1993.

Hotamisligil, G.S.; Murray, D.L.; Choy, L.N.; Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91(11):4854-8, 1994.

Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L.; Spiegelman, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, 95(5):2409-15, 1995.

Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y.; Takahashi, M.; Matsuda, M.; Okamoto, Y.; Iwahashi, H.; Kuriyama, H.; Ouchi, N.; Maeda, K.; Nishida, M.; Kihara, S.; Sakai, N.; Nakajima, T.; Hasegawa, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Hanafusa, T.; Matsuzawa, Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type2 diabetic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 20(6):1595-9, 2000.

Hyams, J.S.; Fitzgerald, J.E.; Treem, W.R.; Wyzga, N.; Kreutzer, D.L. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, 104(5):1285-92, 1993.

Jenmalm, M.C.; Cherwinski, H.; Bowman, E.P.; Phillips, J.H.; Sedgwick, J.D. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. **J Immunol**, 176(1):191-9, 2006.

Jiang, Y.; Beller, D.I.; Frenzl, G.; Graves, D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol**, 148(8):2423-8, 1992.

Díez, J.J.; Iglesias, P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. **European Journal of Endocrinology**, 148 293–300, 2003.

Kamada, N.; Hisamatsu, T.; Okamoto, S.; Chinen, H.; Kobayashi, T.; Sato, T.; Sakuraba, A.; Kitazume, M.T.; Sugita, A.; Koganei, K.; Akagawa, K.S.; Hibi, T. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. **J Clin Invest**, 118(6):2269-80, 2008.

Kameyoshi, Y.; Dörschner, A.; Mallet, A.I.; Christophers, E.; Schröder, J.M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. **J Exp Med**, 176(2):587-92, 1992.

Kasama, T.; Strieter, R.M.; Lukacs, N.W.; Burdick, M.D.; Kunkel, S.L. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. **J Immunol**, 152(7):3559-69, 1994.

Kazumi, T.; Kawaguchi, A.; Sakai, K.; Hirano, T.; Yoshino, G. Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than that with optimal blood pressure. **Diabetes Care**, 25 971–976, 2002.

Kawakami, K.; Kinjo, Y.; Uezu, K.; Yara, S.; Miyagi, K.; Koguchi, Y.; Nakayama, T.; Taniguchi, M.; Saito, A. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. **J Immunol**, 167(11):6525-32, 2001

Kelner, G.S.; Zlotnik, A. Cytokine production profile of early thymocytes and the characterization of a new class of chemokine. **J Leukoc Biol**, 57(5):778-81, 1995.

Kershaw, E.E.; Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, 89(6):2548-56, 2004.

Kishimoto, T.; Akira, S.; Taga, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*. 1992 Oct 23;258(5082):593-7.

Kitamura, M. Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. **J Immunol**, 159(3):1404-11, 1997.

Koch, A.E.; Kunkel, S.L.; Harlow, L.A.; Mazarakis, D.D.; Haines, G.K.; Burdick, M.D.; Pope, R.M.; Strieter, R.M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, 93(3):921-8, 1994.

Koerner, A.; Kratzsch, J.; Kiess, W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 19(4):525-46, 2005.

Kodelja, V.; Müller, C.; Tenorio, S.; Schebesch, C.; Orfanos, C.E.; Goerdt, S. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. **Immunobiology**, 197(5):478-93, 1997.

Konopleva, M., Mikhail, A., Estrov, Z., Zhao, S., Harris, D., Sanchez-Williams, G., Kornblau, S. M., Dong, J., Kliche, K.-O., Jiang, S., Snodgrass, H. R., Estey, E. H., Andreeff, M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. **Blood**, 93, 1668–1676, 1999.

Kurzrock, R.; Redman, J.; Cabanillas, F.; Jones, D.; Rothberg, J.; Talpaz, M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. **Cancer Res**, 53(9):2118-22, 1993.

Janeway Jr, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

Lang, K., Ratke, J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. **Cell Commun Signal**, 23;7:27, 2009.

Li, M.C. e He, S.H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 10:620-625, 2004.

Lin, C.L.; Suri, R.M.; Rahdon, R.A.; Austyn, J.M.; Roake, J.A. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. **Eur J Immunol**, 28(12):4114-22, 1998.

Loetscher, P.; Seitz, M.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M.; Moser, B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. **J Immunol**, 156(1):322-7, 1996.

Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengaman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D., Diehl, A. M. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J**, 12, 57–65, 1998.

Loghmani, F.; Mohammed, K.A.; Nasreen, N.; Van Horn, R.D.; Hardwick, J.A.; Sanders, K.L.; Antony, V.B. Inflammatory cytokines mediate C-C (monocyte chemoattractant protein 1) and C-X-C (interleukin 8) chemokine expression in human pleural fibroblasts. **Inflammation**, 26(2):73-82, 2002.

Low, Q.E. ; Drugea, I.A.; Duffner, L.A.; Quinn, D.G.; Cook, D.N.; Rollins, B.J.; Kovacs, E.J.; DiPietro, L.A. Wound healing in MIP-1 α (-/-) and MCP-1(-/-) mice. **Am J Pathol**, 159(2):457-63, 2001

Lukacs, N.W.; Chensue, S.W.; Smith, R.E.; Strieter, R.M.; Warmington, K.; Wilke, C.; Kunkel, S.L. Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 α by inflammatory granuloma fibroblasts. **Am J Pathol**, 144(4):711-8, 1994.

Lumeng, C.N.; DelProposto, J.B.; Westcott, D.J.; Saltiel, A.R. Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. **Diabetes**, 57(12):3239–46, 2008.

Maeda, K.; Okubo, K.; Shimomura, I.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y.; Matsubara, K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 221 286–289,1996.

Marra, F.; Romanelli, R.G.; Giannini, C.; Failli, P.; Pastacaldi, S.; Arrighi, M.C.; Pinzani, M.; Laffi, G.; Montalto, P.; Gentilini, P. Monocyte chemoattractant protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. **Hepatology**, 29(1):140-8, 1999.

Mattoli, S.; Ackerman, V.; Vittori, E.; Marini, M. Mast cell chemotactic activity of RANTES. **Biochem Biophys Res Commun**, 209(1):316-21, 1995.

Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, 73(2):209-12, 2003.

Muoio, D.M.; Lynis, D.G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16(4):653-66, 2002.

Nicklin, M.J.; Barton, J.L.; Nguyen, M.; FitzGerald, M.G.; Duff, G.W.; Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. **Genomics**, 79(5):718-25, 2002.

Nonogaki, K.; Fuller, G.M.; Fuentes, N.L.; Moser, A.H.; Staprans, I.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. **Endocrinology**, 136(5):2143-9, 1995.

Oda, A.; Taniguchi, T.; Yokoyama, M. Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. **Kobe J Med Sci**, 47: 141–150, 2001.

Ohashi, K.; Parker, J.L.; Ouchi, N.; Higuchi, A.; Vita, J.A.; Gokce, N.; Pedersen, A.A.; Kalthoff, C.; Tullin, S.; Sams, A.; Summer, R.; Walsh, K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. **J Biol Chem**, 285(9):6153-60, 2010.

Otonello, L.; Gnerre, P.; Bertolotto, M.; Mancini, M.; Dapino, P.; Russo, R.; Garibotto, G.; Barreca, T.; Dallegri, F. Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. **J Am Soc Nephrol**, 15: 2366–2372, 2004.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Maeda, K.; Kuriyama, H.; Okamoto, Y.; Hotta, K.; Nishida, M.; Takahashi, M.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, 100(25):2473-6, 1999.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Okamoto, Y.; Maeda, K.; Kuriyama, H.; Hotta, K.; Nishida, M.; Takahashi, M.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Adiponectin, adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through cAMP-dependent pathway. **Circulation**, 102:1296–1301, 2000.

Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Nishida, M.; Matsuyama, A.; Okamoto, Y.; Ishigami, M.; Kuriyama, H.; Kishida, K.; Nishizawa, H.; Hotta, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Yamashita, S.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. **Circulation**, 103: 1057–1063, 2001.

Park, H.Y.; Kwon, H.M.; Lim, H.J.; Hong, B.K.; Lee, J.Y.; Park, B.E.; Jang, Y.; Cho, S.Y.; Kim, H.S. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. **Exp Mol Med**, 33(2):95-102, 2001.

Parkinson, E.K.; Graham, G.J.; Daubersies, P.; Burns, J.E.; Heufler, C.; Plumb, M.; Schuler, G.; Pragnell, I.B. Hemopoietic stem cell inhibitor (SCI/MIP-1 α) also inhibits clonogenic epidermal keratinocyte proliferation. **J Invest Dermatol**, 101(2):113-7, 1993.

Pelleymounter, M.A.; Cullen, M.J.; Baker, M.B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, 269(5223):540-3, 1995.

Perreault, M.; Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nat Med**, 7(10):1138-43, 2001.

Pugin, J.; Schürer-Maly, C.C.; Leturcq, D.; Moriarty, A.; Ulevitch, R.J.; Tobias, P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90(7):2744-8, 1993.

Rand, M.L.; Warren, J.S.; Mansour, M.K.; Newman, W.; Ringler, D.J. Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. **Am J Pathol**, 148(3):855-64, 1996.

Robbins, S.L.; Cotran, R.S.; Kumar, V. **Pathologic basic of disease**. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. 1425 p. ISBN 0-7216-7335-X

Robinson, M.J.; Sancho, D.; Slack, E.C.; LeibundGut-Landmann, S.; Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. **Nat Immunol**, 7(12):1258-65, 2006.

Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. **Imunologia**. 10^a ed. Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

Rollins, B.J.; Pober, J.S. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. **Am J Pathol**, 138(6):1315-9, 1991.

Rot, A.; Krieger, M.; Brunner, T.; Bischoff, S.C.; Schall, T.J.; Dahinden, C.A. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. **J Exp Med**, 176(6):1489-95, 1992.

Samad, F.; Yamamoto, K.; Pandey, M.; Loskutoff, D.J. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. **Mol Med**, 3(1):37-48,1997.

Sartipy, P.; Loskutoff, D.J. Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha. **J Biol Chem**, 278(52):52298-306, 2003.

Schall, T.J.; Bacon, K.; Toy, K.J.; Goeddel, D.V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, 347(6294):669-71, 1990.

Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. **J Exp Med**, 177(6):1821-6, 1993.

Schebesch, C.; Kodelja, V.; Müller, C.; Hakij, N.; Bisson, S.; Orfanos, C.E.; Goerdts, S. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. **Immunology**, 92(4):478-86, 1997.

Scherer, P.E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 26746–26749, 1995.

Schymeinsky, J.; Mócsai, A.; Walzog, B. Neutrophil activation via beta 2 integrins CD11/CD18: molecular mechanisms and clinical implications. **Thromb Haemost**, 98(2):262-73, 2007.

Solovjov, D.A.; Pluskota, E.; Plow, E.F. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alpha M beta2. **J Biol Chem**, 280(2):1336-45, 2005.

Standiford, T.J.; Kunkel, S.L.; Liebler, J.M.; Burdick, M.D.; Gilbert, A.R.; Strieter, R.M. Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 9(2):192-8, 1993.

Stein, M.; Keshav, S.; Harris, N.; Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J. Exp. Med**, 176:287–292.292, 1992.

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. **Diabetes**, 56:2910 –2918, 2007.

Suganami, T.; Nishida, J.; Ogawa, Y.A. Paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25(10):2062-8, 2005.

Sulahian, T.H.; Högger, P.; Wahner, A.E.; Wardwell, K.; Goulding, N.J.; Sorg, C.; Droste, A.; Stehling, M.; Wallace, P.K.; Morganelli, P.M.; Guyre, P.M. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine**, 12(9):1312-21, 2000.

Szekanecz, Z.; Haines, G.K.; Lin, T.R.; Harlow, L.A.; Goerdts, S.; Rayan, G.; Koch, A.E. Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, 37(2):221-31, 1994.

Tanaka, Y.; Adams, D.H.; Hubscher, S.; Hirano, H.; Siebenlist, U.; Shaw, S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. **Nature**, 361(6407):79-82, 1993.

Uysal, K.T; Wiesbrock, S.M.; Marino, M.W.; Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, 389(6651):610-4, 1997.

Visser, M.; Bouter, L.M.; McQuillan, G.M.; Wener, M.H.; Harris, T.B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**, 282(22):2131-5, 1999.

Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R.L; Ferrante, A.W.Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, 112(12):1796-808, 2003.

[Wellen, K.E.; Hotamisligil, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest, 112\(12\):1785-8, 2003.](#)

Wendling, D.; Racadot, E.; Wijdenes, J. Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. **J Rheumatol**, 1993 Feb;20(2):259-62.

World Health Organization: 10 facts on obesity, fev. 2010 [Acesso em: 27 de fev. 2010]. Disponível em <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>.

Yamada, T.; Kawakami, S.I.; Nakanishi, N. Fat Depot-Specific Differences in Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Its Relation to Adipocyte Size in Cattle. **J Vet Med Sci**, Mar 16, 2010

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H.; Terauchi, Y.; Kubota, N.; Hara, K.; Mori, Y.; Ide, T.; Murakami, K.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Ezaki, O.; Akanuma, Y.; Gavrilova, O.; Vinson, C.; Reitman, M.L.; Kagechika, H.; Shudo, K.; Yoda, M.; Nakano, Y.; Tobe, K.; Nagai, R.; Kimura, S.; Tomita, M.; Froguel, P.; Kadowaki, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, 7; 941–946, 2001.

Yang, W.S.; Lee, W.J.; Funahashi, T.; Tanaka, S.; Matsuzawa, Y.; Chao, C.L.; Chen, C.L.; Tai, T.Y.; Chuang, L.M. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. **J Clin Endocrinol Metab**, 86 3815–3819, 2001.

You, T.; Yang, R.; Lyles, M.F.; Gong, D.; Nicklas, B.J. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 288(4):E741-7, 2005.

Zeyda, M.; Farmer, D.; Todoric, J.; Aszmann, O.; Speiser, M.; Györi, G.; Zlabinger, G.J.; Stulnig, T.M. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. **Int J Obes**, 31(9):1420-8, 2007.

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

Zhang, Y.; Matheny, M.; Zolotukhin, S.; Tumer, N.; Scarpace, J.P. Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissue: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1584 115–122, 2002.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372 (6505): 425-32, 1994.

Zhu, J.F.; Valente, A.J.; Lorenzo, J.A.; Carnes, D.; Graves, D.T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human osteoblastic cells stimulated by proinflammatory mediators. **J Bone Miner Res**, 9(7):1123-30, 1994.

Zisman, D.A.; Kunkel, S.L.; Strieter, R.M.; Tsai, W.C.; Bucknell, K.; Wilkowski, J.; Standiford, T.J. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. **J Clin Invest**, 15;99(12):2832-6, 1997

Bragança Paulista, 21 de Fevereiro de 2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: “ Avaliação da participação das adipocitocinas na diferenciação de macrófagos humanos in vitro”.

Autor(es): Profª ALESSANDRA GAMBERO; PROFº DR. CARLOS AUGUSTO R. MARTINEZ

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo CAAE: 0006.0.142.000-08 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

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

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: : APROVADO

Atenciosamente,



MARCELO LIMA RIBEIRO
Vice-coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas – USF
Universidade São Francisco

TERMO DE CONSENTIMENTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS ADIPOCITOCINAS NA DIFERENCIAÇÃO DE
MONÓCITOS EM MACRÓFAGOS HUMANOS *IN VITRO*. 1. COLETA DE SANGUE.

Responsável: Profa. Dra. Alessandra Gambero

O abaixo-assinado _____ (nome,

Idade, RG, Endereço) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade do pesquisador. O abaixo-assinado está ciente que:

i – O objetivo da pesquisa é avaliar a influência de fatores produzidos pelo tecido adiposo na diferenciação de macrófagos *in vitro*.

ii – Durante o estudo, deverá ser coletado um volume de 20 ml de sangue por punção venosa no antebraço utilizando agulha e seringa, sendo o procedimento realizado por profissional de enfermagem.

iii – O sangue coletado será levado para o laboratório e algumas células brancas (leucócitos) serão separadas e utilizadas nos experimentos.

iv – A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico.

v – Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação nesta pesquisa experimental.

vi – Está livre para interromper a participação nesta pesquisa experimental a qualquer momento.

vii – A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe no HUSF.

viii – Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e o HUSF não identificará o voluntário por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

ix – É condição indispensável para participação na pesquisa experimental que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

x – Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contacte a pesquisadora responsável pela pesquisa experimental pelo telefone 11 – 34548982.

xi – Poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico (fone 11 – 4034-8028).

Bragança Paulista, de de 20

Assinatura do voluntário
Nome legível:

Profa. Dra. Alessandra Gambero