

SOLANGE SILVEIRA PEREIRA

***ESTUDO COMPARATIVO DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL E O
SUBCUTÂNEO ENTRE INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS
GRAU III METABOLICAMENTE NORMAIS***

Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Belo Horizonte, MG
2014

SOLANGE SILVEIRA PEREIRA

***ESTUDO COMPARATIVO DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL E
SUBCUTÂNEO ENTRE INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS E OBESOS
GRAU III METABOLICAMENTE NORMAIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline I. Alvarez Leite

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Belo Horizonte, MG
2014

Pereira, Solange Silveira.

Estudo comparativo do tecido adiposo visceral e subcutâneo entre indivíduos eutróficos e obesos grau III metabolicamente normais [manuscrito] / Solange Silveira Pereira. - 2014.

82f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez Leite.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é a força maior que rege todas as minhas realizações e por mais esta conquista;

À Professora Jacqueline pela orientação neste trabalho, pela compreensão e paciência diante das minhas limitações;

Ao Dr. Marco Túlio C. Diniz por auxiliar na viabilização desse trabalho;

Ao Dr. Alexandre L. Savassi Rocha pela realização das coletas de amostras do tecido adiposo no momento da operação bariátrica;

À Professora Adaliene, pela fundamental colaboração para a realização deste trabalho, e também à Marina Chaves pelo auxílio na realização do ELISA;

Ao Professor Luciano Capettini e à Juliana, pela realização do *Western blot*;

Aos colegas Lílian G. Teixeira e Edenil Aguilar pela colaboração em discussões e experimentos;

Aos cirurgiões Dr. Rafael Barbuto, Dr. Henderson e Dr. Admário, pelas coletas de amostras dos indivíduos do grupo controle;

A todos os residentes da cirurgia do aparelho digestivo, ginecologia e anestesia que auxiliaram nas coletas de tecido adiposo e sangue em todo o período de realização de coleta;

Aos pacientes da Equipe de Terapia Nutricional da Obesidade Grave (ETNO) que aceitaram participar desse trabalho, e também aos pacientes da Ginecologia e da Cirurgia de Parede Abdominal que autorizaram a coleta do tecido adiposo no momento da operação;

Aos profissionais do Hospital das Clínicas especificamente do Bloco cirúrgico, do Instituto Alfa de Gastroenterologia, do Anexo Borges da Costa que eventualmente colaboraram para a realização desse trabalho;

A todos queridos amigos do LABIN que também colaboraram e me apoiaram sempre que foi necessário; obrigada também pela amizade;

Aos funcionários e colegas de outros laboratórios que permitiram a utilização de equipamentos necessários para a realização de alguns experimentos;

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pelos conhecimentos transmitidos e pela contribuição em minha formação científica;

Aos secretários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Celise e Orlando, e a auxiliar do LABiN, Poly pela competência nos serviços prestados;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À minha mãe, Elenice, que sempre apoiou minhas escolhas, o que contribuiu muito para essa conquista; obrigada também por ser essa mãe tão dedicada, amorosa, e meu maior exemplo de força e superação;

Aos meus irmãos: Helinho, Mara, Márcia e Franci, por serem os meus melhores amigos, sempre acreditarem em mim e por estarem sempre presentes me amparando nos momentos difíceis durante esses anos;

Às minhas primas e amigas: Dany, Thaísa, Renata e Marcinha por estarem sempre presentes nesse período da minha vida, com sua amizade, carinho e apoio sempre que necessário e também minhas tias Ângela e Helen pelo amparo e carinho tão importantes nesse período;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1- INTRODUÇÃO.....	13
2- OBJETIVOS.....	14
2.1-Objetivo Geral.....	14
2.2-Objetivos Específicos.....	14
3-REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1-Obesidade.....	15
3.2-O tecido adiposo.....	19
3.3-Adipocinas.....	26
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1Indivíduos.....	33
4.2-Avaliação dos pacientes.....	35
4.3-Coleta de Material.....	35
4.4-Histologia do Tecido adiposo.....	36
4.5-Dosagens de adipocinas no soro e tecido adiposo	36
4.6-Quantificação dos níveis de RNAm para leptina, adiponectina, adipoR1, IRS1, GLUT4, TNF, CCL2, IL6, IL10, TGF β , FOXP3 por meio da técnica <i>Real Time</i> -PCR.....	38
4.6.1-Extração de RNA total do tecido adiposo.....	38
4.6.2-Quantificação do RNA total.....	39
4.6.3-Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa.....	39
4.6.4-Amplificação de cDNA por <i>Real Time</i> PCR.....	40
4.7-Determinação da expressão proteica da MMP-2, MMP-8 e MMP-9 por Western blot.....	41
5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
6-RESULTADOS.....	44
6.1-Peso, IMC, % de gordura corporal e parâmetros metabólicos séricos	44
6.2-Área do adipócito.....	45
6.3-Leptinemia e expressão de leptina no tecido adiposo.....	47
6.4- Expressão de adiponectina e o receptor AdipoR1 no tecido adiposo	48
6.5- Expressão de IRS1 e Glut4 no tecido adiposo.....	49

6.6- Concentração sérica, expressão de RNAm e secreção de adipocinas proinflamatórias no tecido adiposo.....	50
6.7- Concentração sérica, expressão de RNAm e secreção de adipocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo.....	52
6.8- Razão e correlação entre concentração de adipocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo	54
6.10-Expressão de metaloproteinases de matriz no tecido adiposo.....	56
7- DISCUSSÃO.....	58
8- CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE TABELAS

1	Peso, IMC, % gordura corporal e, parâmetros metabólicos séricos de indivíduos controles e obesos.....	45
2	Área de adipócitos no TAS e TAV	47
3	Citocinas pró-inflamatórias séricas (IL6, TNF e MCP1) de indivíduos eutróficos e obesos.....	50
4	Coefficiente de correlação estatisticamente significativa entre expressão de FOXP3 e dados antropométricos de indivíduos obesos.....	56
5	Coefficiente de correlação entre MMPs e gordura corporal e TGFβ de indivíduos obesos.....	57

LISTA DE FIGURAS

1	Histologia do tecido adiposo e área do adipócito.....	46
2	Leptina sérica e expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo	48
3	Expressão de RNAm de adiponectina e adipoR1.....	49
4	Expressão de RNAm de IRS1 e GluT4	50
5	Expressão de RNAm e secreção de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo	51
6	Níveis séricos, expressão de RNAm e concentração de adipocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo	53
7	Razão entre concentração de adipocinas no tecido adiposo subcutâneo e visceral e correlação entre adipocinas no tecido adiposo subcutâneo.....	54
8	Expressão de RNAm de FOXP3 no tecido adiposo e Correlação entre FOXP3 e IL6 eTNF no tecido adiposo visceral de obesos	55
9	Expressão de metaloproteinases (MMPs) por <i>Western blot</i> no tecido adiposo.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADIPOR	receptor de adiponectina
AMPK	quinase ativada por adenosina monofosfato
ATPIII	<i>Adult Treatment Panel III</i>
BSA	soroalbumina bovina
CCL2	quimiocina com motivo ligante c-c 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CT	Controle
DIO	dieta indutora de obesidade
DM2	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	ensaio de imunabsorbância ligado à enzima
FOXP3	<i>forkhead</i> box P3
Glut4	transportador de glicose 4
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteína de alta densidade
HE	hematoxilina-eosina
HOMA	modelo de avaliação homeostática
HRP	<i>horseradish</i> peroxidase
IFN γ	interferon γ
IL10	interleucina 10
IL1 β	Interleucina 1 β
IL6	interleucina 6
ILRa	receptor antagonista de interleucina 1
IMC	índice de massa corporal
IRS-1	substrato para receptor de insulina 1
JAK-STAT3	tradutor de sinal e ativador de transcrição 3
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

MCP-1	proteína quimiotática para monócitos
MHO	<i>metabolically healthy but obese</i>
MIP1	proteína inflamatória de macrófago 1
MMP	metaloproteinase de matriz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	fator de transcrição nuclear κB
NKT	célula <i>natural killer T</i>
OMN	obesos metabolicamente normais
OMS	organização mundial da saúde
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio 1
PBS	salina tamponada com fosfato
PI3K	quinase fosfatidil inositol 3
pO ₂	pressão de oxigênio
PT1B	proteína fosfatase de tirosina 1B
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia de polimerase em tempo real
SM	síndrome metabólica
SOC3	supressor da sinalização de citocina tipo 3
TA	tecido adiposo
TAS	tecido adiposo subcutâneo
TAV	tecido adiposo visceral
TCR	receptor de célula T
TGFβ	fator β de transformação do crescimento
Th1/2	<i>T helper</i>
TNF	fator de necrose tumoral
Treg.	célula T reguladora
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

A obesidade está relacionada com desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. Tem sido considerado que alterações que ocorrem no tecido adiposo na obesidade estão implicadas no desenvolvimento dessas doenças. Entretanto nem todos os indivíduos obesos as desenvolvem. O objetivo deste estudo foi comparar a expressão e secreção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, expressão de metaloproteinases de matriz, fatores relacionados à ação da insulina e fatores imunorreguladores no tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos grau III metabolicamente normais e compará-los com indivíduos eutróficos. Houve diferença na expressão de leptina, adiponectina, GluT4 entre os grupos, porém não foi encontrada diferença na expressão de IRS1, CCL2/MCP1, IL-6 e TNF entre os grupos ou tecidos. Os níveis circulantes e a expressão de IL10 foram superiores nos indivíduos obesos, e no tecido adiposo subcutâneo. Embora o nível sérico de TGF β tenha sido similar entre os grupos, a expressão e a secreção são mais elevadas no tecido adiposo de indivíduos obesos em comparação aos dos controles. Expressão de FOXP3 e MMPs foi maior no tecido adiposo subcutâneo e visceral respectivamente de indivíduos obesos, em comparação aos controles. De acordo com esses resultados é possível sugerir que perfil encontrado no tecido adiposo de obesos provavelmente está exercendo efeito protetor no desenvolvimento de doenças metabólicas.

Palavras chave: obesidade, tecido adiposo, adipocinas

ABSTRACT

Obesity is associated with the development of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. It has been described that changes that occur in the adipose tissue of obese individuals are implicated in the development of these diseases. However, not all obese individuals develop them. The aim of this study was to compare the expression and secretion of proinflammatory and anti-inflammatory adipokines, expression of matrix metalloproteinases, factors related to insulin action and immunoregulatory factors in subcutaneous and visceral adipose tissue in grade III obese subjects metabolically normal and compare them with normal individuals. There were differences in the expression of leptin, adiponectin, GLUT4 between groups, but no difference in the expression of IRS1, CCL2/MCP1, IL6 and TNF tissues or between groups was found. Circulating levels and the expression of IL10 were higher in obese, and subcutaneous adipose tissue. Although the serum level of TGF β be similar between groups, the expression and secretion are higher in adipose tissue of obese subjects compared to controls. Expression of MMPs and FOXP3 was higher in visceral and subcutaneous in obese subjects respectively, compared to controls adipose tissue . According to these results it is possible to suggest that profile found in adipose tissue of obese is probably exerting a protective effect on the development of metabolic diseases.

Key words: obesity, adipose tissue, adipokines.

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e é caracterizada como estado inflamatório crônico de baixo grau implicado no desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Sell & Eckel 2010; Chang et al. 2011; de Heredia et al. 2012). Complicações relativas à obesidade têm relação direta com a expansão da massa de tecido adiposo, e evidenciam a influência deste tecido no balanço energético e na gênese de alterações metabólicas e inflamatórias (Trayhurn 2007). O tecido adiposo tem função metabólica bem estabelecida, reconhecido hoje como importante fonte de hormônios e citocinas denominadas adipocinas dentre essas: leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), proteína quimiotática para monócitos (MCP1/CCL2), angiotensinogênio, dentre outras (De Lorenzo et al. 2007; Ouchi, et al. 2011). A expansão do tecido adiposo é caracterizada pela hipertrofia do adipócito, seguido de infiltração de células imunológicas, superprodução de matriz extracelular e produção de adipocinas pró-inflamatórias (Suganami & Ogawa 2010). O risco de desenvolvimento de complicações relacionadas é proporcional ao grau de obesidade, mais especificamente ao acúmulo de gordura visceral. Entretanto, a presença desses distúrbios metabólicos varia amplamente entre indivíduos obesos (Primeau et al. 2011). Foi demonstrado que na população americana mais de 30% dos indivíduos obesos são metabolicamente normais, enquanto aproximadamente 23% dos indivíduos eutróficos exibem anormalidades metabólicas (Pataky et al. 2011). Diferentes estudos sobre obesos metabolicamente normais (OMN) têm sido publicados, entretanto, não existe classificação uniforme para esse fenótipo, o que

reflete em faixa ampla de incidência da população de obesos, de acordo com os diferentes critérios de classificação, sendo necessário consenso de classificação até o momento não estabelecido (Pataky et al. 2010). Os mecanismos que podem explicar o perfil metabólico favorável de OMN ainda são desconhecidos. Portanto, investigações para ampliar a compreensão sobre a fisiopatologia das características metabólicas de proteção no indivíduo OMN podem conduzir à melhor compreensão dos mecanismos de resistência à insulina e fatores envolvidos na etiologia do Diabetes Mellitus tipo 2 e das doenças cardiovasculares (Primeau et al. 2011).

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Estudar a expressão e a secreção de adipocinas, perfil inflamatório, indicadores de resistência à insulina do tecido adiposo visceral e subcutâneo de indivíduos obesos grau III metabolicamente normais, comparando-os aos dados de indivíduos eutróficos.

2.2- Objetivos específicos

- Avaliação de altura, peso, e peso da massa adiposa total dos indivíduos e comparar entre os grupos obesos metabolicamente normais e controles
- Avaliar perfil metabólico nos indivíduos dos dois grupos

- Comparar as características como: tamanho do adipócito no tecido adiposo visceral e subcutâneo visando caracterizar diferenças específicas conforme a localização anatômica do tecido
- Avaliação da expressão do RNA mensageiro de leptina, adiponectina, AdipoR1, IRS1, GluT4, TNF, IL6, MCP1/CCL2, IL10, TGF β e FOXP3 no tecido adiposo visceral e subcutâneo
- Avaliar a secreção de adipocinas: TNF, IL6, MCP1/CCL2, IL10 e TGF β no tecido adiposo visceral e subcutâneo
- Avaliação dos níveis séricos das adipocinas leptina, TNF, IL6, MCP1/CCL2, IL10 e TGF β
- Avaliação da expressão das metaloproteinases de matriz, MMP2, 8 e 9 no tecido adiposo visceral e subcutâneo
- Comparar todos os dados encontrados entre a localização do tecido adiposo, subcutâneo e visceral, e entre os grupos, obeso e eutrófico
- Correlacionar os dados de expressão e secreção encontrados entre si e com a adiposidade total, peso e IMC

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pela expansão do tecido adiposo, prevalente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, que afeta crianças e adultos (Leal Vde & Mafra 2013). A Organização Mundial de Saúde

(OMS) estimou que em 2008, 1,5 bilhões de adultos tinham sobrepeso e mais de 10% destes eram obesos, e que em 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso, e dentre estes 700 milhões serão obesos (Ahima 2011; Harford et al. 2011; Tzanetakou et al. 2012).

A obesidade tem um componente inflamatório como muitas doenças crônicas, que tem forte relação com o desenvolvimento de doenças metabólicas (de Heredia et al. 2012). O risco de desenvolvimento de complicações relacionadas à obesidade é proporcional ao grau de obesidade e mais especificamente ao acúmulo de gordura andróide (Primeau et al. 2011).

Existe correlação direta entre complicações relativas à obesidade com o aumento dos marcadores inflamatórios no tecido adiposo. Evidências crescentes têm apontado a influência da inflamação crônica de baixo grau no tecido adiposo na gênese de alterações metabólicas em obesos (Ouchi et al. 2011). É consenso que o aumento do tecido adiposo visceral (omental) tem mais correlação com indicadores de resistência à insulina que o tecido adiposo subcutâneo abdominal (Fain 2010). A distribuição anatômica da deposição de gordura tem impacto marcante no nível de risco. Indivíduos com obesidade abdominal, que possuem acúmulo de tecido adiposo visceral (TAV), têm risco aumentado de desenvolvimento de resistência à insulina, ou síndrome metabólica, que precedem o desenvolvimento do DM2 e está frequentemente associado às dislipidemias.

Baseado em estudos com imagem de ressonância magnética, disfunções metabólicas associadas à obesidade, estão correlacionadas com o aumento do TAV e não com o do tecido adiposo subcutâneo (TAS) (Despres et al. 2008). Atualmente, está bem descrita a influência do tecido adiposo no desenvolvimento de desordens metabólicas relacionadas à obesidade abdominal. Embora o tecido adiposo

subcutâneo seja mais extensivamente estudado devido ao fácil acesso para investigação clínica, poucos estudos têm mostrado resultados para o TAV (Bigornia et al. 2012)

Alterações que ocorrem no tecido adiposo associado à adiposidade aumentada, como aumento no tamanho do adipócito, presença aumentada de macrófagos e desregulação de citocinas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, podem estar implicadas na patofisiologia cardiovascular, e são capazes de modificar o risco para doenças cardiovasculares (Marinou et al. 2010). Entretanto, a presença de desordens metabólicas relacionadas à obesidade varia amplamente entre os indivíduos obesos (Primeau et al. 2011)

Tem sido descrito atualmente um subgrupo de indivíduos obesos que parecem estar protegidos ou pelo menos são mais resistentes ao desenvolvimento de desordens metabólicas associadas à obesidade. Esses indivíduos são classificados como “metabolicamente saudáveis, porém obesos” (*metabolically healthy but obese* - MHO) ou obesos metabolicamente normais (OMN). Apesar do excesso de gordura corporal, exibem perfis metabólicos favoráveis caracterizados por sensibilidade normal à insulina, ausência de hipertensão arterial e perfil lipídico, hormonal, inflamatório, hepático e imunológico favoráveis (Primeau et al. 2011). Atualmente não existe definição uniforme para diferentes fenótipos de obesidade. Geralmente a obesidade metabolicamente normal é definida como aquela com ausência de qualquer desordem metabólica incluindo DM2, dislipidemia e hipertensão arterial em indivíduo com IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$ (Bluher 2010). Adicionalmente à ausência de comorbidades, as associações e agrupamentos de fatores de risco cardiometabólicos, como componentes da síndrome metabólica ou marcadores pró-inflamatórios, também têm sido utilizados para categorizar indivíduos em

metabolicamente normais ou não (Pataky et al. 2010). A prevalência de indivíduos OMN depende muito da definição utilizada. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem prevalência entre 10 e 40% de OMN (Primeau et al. 2011). Em um dos maiores estudos usando amostra representativa da população geral americana foi demonstrada prevalência de 51,3% de indivíduos com sobrepeso e 31,7% de obesos metabolicamente normais, enquanto 23,5% dos indivíduos com IMC normal ($\leq 25\text{kg/m}^2$) exibem um grupo de anormalidades metabólicas (Pataky et al. 2011; Wildman et al. 2008).

Os mecanismos que podem explicar o perfil metabólico favorável nesses indivíduos, ainda são desconhecidos. Características do tecido adiposo como: tamanho do adipócito, diferenças relacionadas aos diferentes depósitos, perfil de expressão gênica relacionado às vias metabólicas e perfil inflamatório, além de características relacionadas à sensibilidade à insulina muscular podem estar envolvidos nesse perfil protetor dos OMN (Primeau et al. 2011).

A dificuldade em classificar esses indivíduos é reflexo da dificuldade em caracterizar normalidade metabólica, que varia em diferentes estudos. Alguns autores têm selecionado, como critério de normalidade, a ausência ou presença de somente um dos parâmetros da síndrome metabólica de acordo com a ATPIII (Grundy et al. 2004) , enquanto outros têm baseado a definição de acordo com a sensibilidade à insulina (Wildmal et al. 2008; Pataky et al. 2010; Pataky et al. 2011) Entretanto, a utilização de testes de sensibilidade à insulina tem sido criticada para a determinação da normalidade metabólica, como o índice HOMA, cujo limiar varia bastante entre diferentes estudos, além de diferentes testes variarem conforme diferentes sexos e populações (Pataky et al. 2010; Pisprasert et al. 2013). Em muitos estudos com indivíduos OMN, a maior sensibilidade à insulina foi acompanhada de

menor glicemia de jejum e níveis de insulina (Marini et al. 2007). Vários estudos também têm demonstrado menores níveis de hemoglobina glicada em OMN, além de melhor perfil lipídico, perfil de enzimas hepáticas e melhor perfil inflamatório quando comparados a indivíduos obesos metabolicamente desregulados (Karelis et al. 2004; Karelis et al. 2005; Messier et al. 2010). Resultados relacionados à pressão sanguínea são menos consistentes que aqueles relacionados ao perfil lipídico. Alguns estudos observam menor pressão sanguínea em OMN, enquanto outros não (Karelis et al. 2005; Marini et al. 2007; Primeau et al. 2011). No geral, os estudos atuais indicam que os indivíduos OMN têm um perfil de saúde intermediário, que é mais saudável em relação aos outros obesos com comorbidades, porém menos saudáveis que os adultos com IMC normal, categorizados como saudáveis (Durward et al. 2012).

O interesse em compreender a obesidade metabolicamente normal é crescente, devido ao potencial para esclarecer os mecanismos das doenças crônicas e traduzi-los em opções de tratamento. Entretanto, ainda não está claro o quanto esses indivíduos OMN estão protegidos do risco aumentado de doenças crônicas e mortalidade associada à obesidade. Enquanto alguns estudos demonstram proteção, outros sugerem que OMN representa apenas atraso no desenvolvimento na progressão dessas doenças (Karelis et al. 2004; Primeau et al. 2011; Durward et al. 2012)

3.2 - O tecido adiposo

O tecido adiposo sempre foi tradicionalmente considerado um órgão para depósito de energia em longo prazo, porém, está bem definido atualmente o seu

papel fundamental na integração do metabolismo sistêmico. Essa função metabólica é mediada, em parte, pela habilidade em secretar numerosas proteínas, coletivamente chamadas de adipocinas (Ouchi et al. 2011). O tecido adiposo inclui adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos e células do sistema imune (Lee et al. 2010). Diversos estudos têm evidenciado que o tecido adiposo não é uniforme. Dependendo da localização corporal existem diferenças na capacidade de secreção de adipocinas, bem como variação celular com diferentes fenótipos. Dentre as variações estão a quantidade e proporção de adipócitos, células estromais e do sistema imune (Coelho et al. 2013). O tecido adiposo é geralmente separado em tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS). O TAV refere-se ao tecido adiposo no interior da cavidade abdominal incluindo predominantemente os depósitos omental e mesentérico, o que representa entre 10 e 20% da gordura corporal total de homens obesos e magros, e entre 5 e 10% de gordura total em mulheres (Kaminski & Randall 2010). O tecido adiposo subcutâneo representa aproximadamente 80% da massa de gordura total em indivíduos saudáveis. Embora o TAS represente aproximadamente 80% do tecido adiposo humano, o TAV é metabolicamente mais ativo, e o acúmulo é mais preditivo de mortalidade associada à obesidade (Girard & Lafontan 2008).

As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, além de função hormonal e de metabolismo, também têm atividade pró e anti-inflamatórias. A expressão desregulada dessas adipocinas causadas pelo excesso de adiposidade e disfunção do adipócito na obesidade tem sido relacionada à patogênese de diversas doenças por meio de respostas imunes alteradas (Ouchi et al. 2011). As mudanças no perfil de adipocinas conforme a quantidade e a condição do tecido adiposo levam a distúrbios metabólicos que desempenham papel central no desenvolvimento de

resistência á insulina, DM2 e aumento no risco de doenças cardiovasculares característicos da obesidade (Leal Vde & Mafra 2013).

O estado de inflamação crônica de baixo grau tipicamente associado à obesidade é caracterizado por infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Macrófagos do tecido adiposo são classificados em dois principais tipos de acordo com marcadores de superfície e perfil de citocinas secretado. Macrófagos do tipo M1 ou classicamente ativados, têm perfil de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL6 e IL1 β . Em contraste macrófagos do tipo M2, ou alternativamente ativados, expressam fatores anti-inflamatórios como IL10, TGF β , dentre outras. A obesidade induz mudança de fenótipo de macrófagos M2 para M1, caracterizados por redução na produção de citocinas anti-inflamatórias e aumento nas pró-inflamatórias (Kalupahana et al. 2012). Tal condição é crucial para o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes e diversas complicações relacionadas à obesidade (Itoh et al. 2011; Alkhoury et al. 2010). Cinti et al. (2005) demonstraram que mais de 90% dos macrófagos do tecido adiposo de camundongos e humanos obesos estão localizados em torno de adipócitos mortos formando estruturas semelhantes a coroas. A frequência de morte do adipócito aumenta dramaticamente em camundongos e humanos obesos e em um modelo experimental de hipertrofia do adipócito sem obesidade. A morte do adipócito de obesos aumenta significativamente devido a hipertrofia que leva à hipoxia. Possivelmente os macrófagos são recrutados para o tecido adiposo para eliminar os detritos celulares restantes. De fato, macrófagos se acumulam preferencialmente em regiões de hipoxia em tecido adiposo de camundongos obesos, e marcadores para macrófagos são negativamente correlacionados com a pO₂ no tecido adiposo em humanos (Harford et al. 2011). Portanto a hipoxia parece ser importante evento envolvido no

acúmulo de macrófagos M1 e modulação na produção de diversas adipocinas no tecido adiposo (Lolmede et al. 2011). Recentes estudos têm demonstrado o envolvimento da quantidade de macrófagos M1 e da razão M1/M2 no desenvolvimento de resistência à insulina (Fujisaka et al. 2009). Com o desenvolvimento da obesidade, o adipócito hipertrofiado secreta quimiocinas que atraem células imunes. Os macrófagos estão entre as primeiras células a infiltrarem o tecido adiposo, e embora seja vital na imunidade inata e adaptativa, a resposta imune é o resultado de interações entre diferentes tipos celulares (Patel et al. 2013). Fatores solúveis secretados por leucócitos influenciam reciprocamente a atividade de adipócitos, bem como de células endócrinas e musculares, o que por sua vez interfere nos níveis de nutrientes (particularmente a glicose), insulina e outras adipocinas. Tudo isso contribui para rede metabólica sensível a interações complexas (Kaminski & Randall 2010). Assim, as células T reguladoras, células T efetoras CD8+, Células T CD4+ (Th1 e Th2), células T natural killer (NKT), células B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos presentes no tecido adiposo também têm sido implicados na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade (Suganami & Ogawa 2010; Lolmede et al. 2011; Bertola et al. 2012; Kalupahana et al. 2012; Patel et al. 2013).

Novos estudos apontam que células T reguladoras CD4⁺FOXP3⁺ estão presentes em grande quantidade no tecido adiposo de camundongos magros, e que essa quantidade é notavelmente menor no tecido adiposo visceral de camundongos obesos resistentes à insulina e alimentados com dieta rica em gordura (Bertola et al. 2012; DeMarco et al. 2010). Inflamação no tecido adiposo e índices metabólicos locais e sistêmicos melhoraram ou pioraram com aumento ou redução global, respectivamente, de células T reguladoras (Cipolletta et al. 2012). As células T

reguladoras CD4⁺FOXP3⁺ são população chave no controle da resposta imune e têm atraído atenção como potente população imunossupressora em desordens inflamatórias (Eller et al. 2011). O potencial papel dessas células em modular a inflamação no tecido adiposo foi demonstrado com experimentos de perda e ganho de função (Cipolletta et al. 2011). É geralmente aceito que as células T reguladoras inibem as células alvo por meio de contato direto célula-célula, e que os efeitos imunomoduladores são executados principalmente pelo meio de citocinas, tais como IL10 e TGFβ (Chen & Oppenheim 2011; Deiluiis et al. 2011; Eller et al. 2011). Os efeitos supressores das células Treg. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no sistema imune inato está bem documentado. Dentre esses supressão na proliferação de células T, inibição na produção de citocinas próinflamatórias (INFγ, TNF e IL6) e mudança na polarização de macrófagos de M1 para M2 mediada pela IL10 (Tiemessen et al. 2007). A correlação observada no trabalho de Feuerer et al. (2009) entre obesidade e resistência à insulina, e escassez de células T CD4⁺FOXP3⁺ no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos, sugere que células Treg. podem estar implicadas na relação entre a resposta inflamatória e parâmetros metabólicos na obesidade. Outro estudo evidenciou que a modulação de Treg. no tecido adiposo pode oferecer uma nova estratégia potencial para o tratamento de desordens metabólicas relacionadas à obesidade, tais como a resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Chen et al. 2013).

O tecido adiposo é submetido a processo de remodelagem contínua, que normalmente mantém a saúde do tecido, mas pode sair do controle e levar a morte dos adipócitos em associação com o recrutamento e ativação dos macrófagos, e resistência sistêmica à insulina (Lee et al. 2010). Sob constante excesso de ingestão de calorias, os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia, estabelecendo

assim eventos dinâmicos de expansão do tecido adiposo. A hipertrofia resulta em secreção alterada de produtos, que com o tempo, afeta negativamente a remodelagem do tecido adiposo. Em paralelo, a hipertrofia fornece proteção valiosa contra os efeitos lipotóxicos sistêmicos nocivos pelo excesso de exposição de lipídeos.

Importante distinção deve ser estabelecida entre expansão saudável e expansão patológica do tecido adiposo. (Sun et al. 2011) definiram expansão saudável como aumento da massa de gordura por meio de maior recrutamento de precursores de adipócitos, células que são diferenciadas em pequenos adipócitos, juntamente com o recrutamento de outros tipos de células do estroma com razões adequadas, e subsequente vascularização com indução mínima de inflamação e de matriz extracelular. Em contraste, a expansão patológica do tecido adiposo pode ser descrita por rápido crescimento da camada de gordura por meio do aumento das células de gordura existentes, alto grau de infiltração de macrófagos, desenvolvimento limitado dos vasos e fibrose maciça. A matriz extracelular não tem como função única o suporte mecânico, mas também regula os eventos fisiológicos e patológicos da remodelagem do tecido adiposo durante a expansão por meio de variedade de vias de sinalização (Sun et al. 2011). O tempo de curso da remodelagem do tecido coincide com a melhora da resistência à insulina sugerindo que o processo de remodelagem tem consequências metabólicas no organismo. Mecanismos que regulam a remodelagem do tecido adiposo e respectivas consequências diferem substancialmente entre os depósitos. Características anatômicas, de crescimento, regulação gênica de proteases e composição da matriz extracelular são diferentes entre os depósitos de tecido adiposo (Christiaens & Lijnen 2006).

O tecido adiposo omental é conhecido por secretar diversos compostos que envolvem angiogênese e a proteólise da matriz extracelular. A excessiva rigidez da matriz extracelular provoca tensão e pode limitar a hipertrofia do adipócito, portanto a remodelagem da matriz é requerida para esse processo (Lee et al. 2010; Cristancho & Lazar 2011). Sistemas proteolíticos, tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), contribuem para a remodelagem do tecido pela degradação da matriz extracelular e componentes da membrana basal ou pela ativação de fatores de crescimento latentes (Christiaens et al. 2008). Várias linhas de evidência sugerem o potencial papel das metaloproteinases no desenvolvimento do tecido adiposo, na angiogênese e adipogênese (Lemoine et al. 2013). Estudos demonstraram que as MMPs 2 e 9 podem ser reguladores chaves no processo de diferenciação do adipócito e na angiogênese do tecido adiposo (Bouloumie et al. 2001; Oh et al. 2012).

O tecido adiposo é dinamicamente envolvido na regulação da função celular e na gênese de doenças por meio de complexa rede de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos que influenciam a resposta de muitos tecidos, incluindo hipotálamo, pâncreas, fígado, músculo esquelético, rins, endotélio, e sistema imune dentre outras (Coelho et al. 2013; Li et al. 2011). Esses sinais são mediados por diversas adipocinas produzidas que incluem hormônios, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e citocinas. Dentre esses leptina, adiponectina, resistina, quimiocinas, como a proteína quimiotática para monócitos e macrófagos (CCL2), citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL6), 1β (IL1 β), fator de necrose tumoral (TNF), anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL10) e o fator β de transformação do crescimento (TGF β), dentre outras.

3.3- Adipocinas

Leptina: é um hormônio peptídeo não glicosilado de 16 kDa, constituído de 167 aminoácidos (Gualillo et al. 2007). É produto do gene *ob*, expressa e produzida principalmente por adipócitos maduros diferenciados do tecido adiposo branco, e em menor extensão por outros tecidos. O tecido adiposo subcutâneo é a principal fonte de secreção (Leal Vde & Mafra 2013). A produção de leptina aumenta com a expansão do tecido adiposo, é proporcional à quantidade de gordura corporal e é mais elevada em mulheres (Pujanek et al. 2013). O principal efeito biológico é o controle da ingestão alimentar e aumento do gasto energético por ativação de receptores altamente expressos no hipotálamo (Jung & Kim 2013). No entanto, a obesidade está associada à resistência à leptina, que se manifesta como hiperleptinemia com possíveis consequências na ativação de células do sistema imune (de Heredia et al. 2012). Não está claro se a resistência à leptina é a principal contribuição para a obesidade ou se é secundária à maior produção em obesos (Ye & McGuinness 2013). A hiperleptinemia seguida da resistência à leptina pode ser importante causa da disfunção do adipócito e respectivas consequências, e da sobrecarga de lipídeos em tecidos periféricos na obesidade, fator favorável ao desenvolvimento de resistência à insulina (Vazquez-Vela et al. 2008). A resistência à leptina pode ser explicada por vários mecanismos, incluindo defeito no transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica e sinalização prejudicada nos neurônios e outras células alvo. Expressão aumentada de proteínas que bloqueiam a sinalização de leptina como a proteína fosfatase de tirosina 1B (PTP1B) e supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3) em obesos evidencia mecanismo adicional de resistência neuronal (Leal Vde & Mafra 2013). A leptina induz a

expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células T, e ativa vias de inflamação usadas por receptores de citocinas pró-inflamatórias, incluindo as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), tradutor de sinal e ativador de transcrição 3 (JAK-STAT3) e fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K). A via de sinalização e o padrão de expressão sugerem que a leptina possa mediar respostas inflamatórias (Ouchi et al. 2011; Ye & McGuinness 2013).

Adiponectina: é uma proteína plasmática de 30kDa, codificada pelo gene AdipoQ, localizada no cromossomo 3q27. Embora o gene AdipoQ seja expresso principalmente em adipócitos, estudos têm evidenciado que a expressão de adiponectina pode ser induzida em outras células (Yadav et al. 2012). Estruturalmente está relacionada ao fator C1q do sistema de complemento e também tem semelhança com o colágeno VIII e X. Circula abundantemente no plasma em várias formas multiméricas, como trímeros de baixo peso molecular até dodecâmeros de alto peso molecular. Tem sido sugerido que a forma complexa de alto peso molecular é a forma mais ativa e contribui para a maioria dos efeitos metabólicos periféricos da adiponectina (Galic et al. 2010).

Em contraste à maioria das adipocinas, a expressão de adiponectina diminui com o aumento da adiposidade, é altamente expressa no tecido adiposo subcutâneo e está reduzida no plasma de obesos (Lenz & Diamond 2008; Ye & McGuinness 2013). A adiponectina tem amplo espectro de efeitos metabólicos e anti-inflamatórios e age principalmente via dois receptores: o AdipoR1 encontrado no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo e o AdipoR2 encontrado no fígado e tecido adiposo (Bray et al. 2009; Lago et al. 2009). Os receptores AdipoR1 e R2 medeiam a ação da adiponectina principalmente por meio do aumento nas atividades da AMP-

quinase (AMPK) (Yamauchi & Kadowaki 2008; Ouchi et al. 2011). Os efeitos metabólicos da adiponectina são a melhora na sensibilidade à insulina, inibição na entrada de ácidos graxos não esterificados, oxidação de ácidos graxos e redução na secreção de glicose no fígado; e aumento na captação de glicose e adipogênese no tecido adiposo. No músculo, esta estimula o metabolismo da glicose e acelera a oxidação de ácidos graxos livres (Lenz & Diamond 2008; Coelho, Oliveira et al. 2013). O efeito anti-inflamatório e anti-aterogênico deve-se à inibição do crescimento de precursores de macrófagos e a diferenciação em células espumosas, a inibição da adesão de monócitos e inibição na remodelagem e proliferação de células musculares da parede vascular. A adiponectina é inversamente associada à expressão de molécula de adesão caracterizando o efeito de proteção vascular. Estudos *in vitro* mostraram que a adiponectina pode reduzir a resposta inflamatória em células endoteliais por meio da inibição do TNF induzida pelo Fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB). Todos estes estudos, em conjunto, sugerem que a adiponectina é o único hormônio derivado do adipócito que possui propriedades anti-inflamatórias, anti-aterogênicas e antidiabéticas (Bray et al. 2009; Leal Vde & Mafra 2013).

Fator de Necrose Tumoral (TNF): Foi descrito como o primeiro fator derivado do tecido adiposo que representa associação entre obesidade, inflamação e diabetes. (Hotamisligil et al. 1993) demonstraram aumentada expressão de RNAm de TNF na obesidade e desde então este tem sido fortemente implicado na patogênese da resistência à insulina. Anteriormente, sugeriu-se que o adipócito fosse a principal fonte de TNF na obesidade. Entretanto tem sido reconhecido que macrófagos do estroma vascular, principalmente do tipo M1 são a principal fonte derivada do tecido

adiposo de obesos (Galic et al. 2010; Coelho et al. 2013). A expressão aumentada de RNAm de TNF no tecido adiposo é altamente induzida por obesidade, e é maior no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (Zou & Shao 2008; Maury & Brichard 2010).

TNF provavelmente está envolvido na síndrome metabólica (SM). Altos níveis foram observados em indivíduos com SM. A relação entre níveis elevados de TNF e SM está relacionada com a capacidade do TNF em mediar a resistência à insulina. TNF induz a fosforilação de um resíduo de serina do substrato para receptor de insulina 1 (IRS-1) pela cJun-quinase NH2-terminal. Isto determina a inibição da fosforilação adequada de tirosina do IRS-1 e consequentemente inadequada sinalização da insulina (Balistreri, Caruso et al. 2010). Outro mecanismo descrito é a inibição da lipase lipoprotéica (LPL), e aumento na mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo para a corrente sanguínea, que acarreta resistência à insulina em tecidos periféricos como o fígado e músculos. (Guilherme et al. 2008; Hermsdorff et al. 2008). Além de estar envolvido no aumento da resistência à insulina, o TNF é também uma citocina pró-inflamatória. Tem ação parácrina e autócrina e influencia substancialmente a síntese de adipocinas pró-inflamatórias, por meio da ativação do NF κ B, aumentando a expressão de IL6, CCL2/MCP1, e do próprio TNF, e diminuindo a expressão de adiponectina (Gualillo et al. 2007; Bray et al. 2009). Está bem definido que a resistência à insulina induzida por dieta ou obesidade é mediada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF, de uma forma dependente de NF κ B (Lee 2013).

Interleucina 6 (IL6) é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida em múltiplos processos fisiológicos incluindo inflamação, lesão tecidual e defesa do hospedeiro

(Bray et al. 2009). Aproximadamente um terço da IL6 circulante é sintetizado pelo tecido adiposo. Níveis aumentados de IL6 estão positivamente correlacionados com obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina e são preditivos para o desenvolvimento DM2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. A produção de IL6 pelo tecido adiposo visceral é três vezes maior em comparação ao subcutâneo, e fornece potencial ligação entre gordura visceral e resistência à insulina, bem como gordura visceral e inflamação (Maury & Brichard 2010). A hipertrofia do adipócito e os estímulos inflamatórios como o TNF favorecem a produção aumentada de IL6. A expressão pelo tecido adiposo e os níveis circulantes diminuem com a perda de peso (Hermsdorff et al. 2008; Ouchi et al. 2011).

Os mecanismos que associam IL6 com resistência à insulina assemelham-se aos descritos para o TNF, como a desregulação na sinalização da insulina por meio da fosforilação do resíduo de serina no IRS-1 e inibição na LPL com consequente aumento na liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo. A IL6 suprime ações metabólicas, mediada pela insulina em hepatócitos, por um mecanismo que é mediado pela expressão de SOCS-3 (Ouchi et al. 2011). Adicionalmente induz a produção de proteína C reativa no fígado, um importante fator de risco para doença cardiovascular e este foi associado com hipertrigliceridemia relacionada à obesidade por estimular a secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Leal Vde & Mafra 2013). Por outro lado, a IL6 pode sensibilizar células musculares para os efeitos da insulina como a síntese de glicogênio e captação de glicose. A diferença nas vias de sinalização utilizadas pela IL6 pode fornecer explicações para os controversos resultados na ação da insulina, em diferentes órgãos periféricos, como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Hoene & Weigert 2008).

CCL2 conhecida também como MCP-1 (proteína quimiotática para monócitos 1), é produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais, recruta células do sistema imune para os sítios de inflamação e a expressão é aumentada em lesões ateroscleróticas (Kanda et al. 2006; Shoelson et al. 2007). Níveis plasmáticos elevados e superexpressão no tecido adiposo têm sido encontrados em humanos obesos com resistência à insulina (Tan et al. 2012). A expressão é maior em células do estroma vascular em relação aos adipócitos, e no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (Maury & Brichard 2010). Kanda et al. (2006) demonstraram que o aumento na expressão de CCL2 induziu aumento na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, na resistência à insulina, e aumentou o conteúdo hepático de triglicerídeos em camundongos. Adicionalmente, a deleção do gene para CCL2 diminuiu a extensão do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, a resistência à insulina e a esteatose hepática associada à obesidade. A CCL2 é regulada positivamente pela leptina, tem expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos geneticamente obesos diabéticos (*db/db*) e com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Kanda et al. 2006). A CCL2 desempenha importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade por meio da indução de resposta inflamatória no tecido adiposo, e tem papel fundamental na patogênese da síndrome metabólica (Bourlier & Bouloumie 2009).

Interleucina 10 (IL10) é uma citocina anti-inflamatória clássica que suprime a transdução de sinal de citocinas pró-inflamatórias. É produzida principalmente por macrófagos ativados do tipo M2 e linfócitos Th2 (Itoh et al. 2011; Ye & McGuinness 2013). É expressa também por adipócitos e cria um ambiente anti-inflamatório no tecido adiposo em condições fisiológicas. IL10 inibe a produção de TNF, IL6, IL1 β ,

quimiocinas e aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL1Ra. Altos níveis têm sido observado na obesidade (Balistreri et al. 2010). Esposito et al. (2003) demonstraram que níveis circulantes de IL10 são elevados em mulheres obesas e que baixos níveis de IL10 são associados com a síndrome metabólica em mulheres com ou sem obesidade. O tratamento com IL10 melhorou a inflamação no tecido adiposo e no fígado, e melhorou o metabolismo lipídico e de glicose hepáticos em camundongos obesos (Gotoh et al. 2012). Camundongos com dieta indutora de obesidade que superexpressam IL10 têm maior sensibilidade muscular à insulina devido à atenuação na resposta inflamatória e melhora na sinalização de insulina muscular (Hong et al. 2009). Foi encontrado aumento na expressão e secreção de IL10 em células T reg. FOXP3+ em camundongos obesos. Nesse mesmo estudo a administração de IL10 em adipócitos de cultura inibiu a expressão de todos os genes pró-inflamatórios induzidos por TNF, inclusive o próprio TNF. Além disso, reverteu a regulação negativa do IRS-1 e do Glut4 estimulada pelo TNF, restaurando a sinalização adequada da insulina, indicando papel importante dessa citocina na reversão da resistência à insulina (Feuerer et al. 2009).

Fator β de transformação do crescimento (TGF β): é membro de uma família de fatores de crescimento que compreende pelo menos 30 membros em mamíferos (Weiss & Attisano 2013). Quase todos os tipos celulares em roedores e humanos podem produzir e responder ao TGF β . Primeiramente descoberto como fator crítico para o crescimento de células não imunológicas, tem sido reconhecido gradualmente como uma citocina crítica em regular respostas imunes (Chen & Konkel 2010). O papel descrito para o TGF β até então é relativo ao efeito inibitório sobre crescimento e ativação de células do sistema imune como neutralizador potente da ativação de

macrófagos, inibição de células B e T, dentre outras. No entanto tem sido descoberto recentemente o papel na indução da expressão de FOXP3 em células T CD4⁺CD25⁻ FOXP3⁻ convertendo então em células T reguladoras FOXP3⁺. Essa conversão ocorre em camundongos e humanos (Chen & Oppenheim 2011; Maruyama et al. 2011). O nível de TGFβ no tecido adiposo é fortemente associado com obesidade mórbida, e tem sido sugerido importante papel na biologia do tecido adiposo subcutâneo e visceral (Yadav et al. 2011; Tan et al. 2012). A expressão de TGFβ correlaciona-se positivamente com obesidade em modelos animais, e em humanos, porém inibe *in vitro* a adipogênese de células 3T3-F442A. Alternativamente o TGFβ pode promover adipogênese em células progenitoras multipotentes na expansão inicial do tecido adiposo, mas inibe a adipogênese em populações de pré-adipócitos comprometidos. O exato papel do TGFβ na adipogênese e na obesidade permanece obscuro e necessita de mais estudos (Cristancho & Lazar 2011).

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Indivíduos

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG). Participaram 16 indivíduos obesos pacientes do ambulatório da Equipe de Terapia Nutricional da Obesidade Grave (ETNO) do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG), que foram submetidos à operação bariátrica, devido IMC maior que 40 kg/m² e insucesso em tratamentos conservadores para obesidade. Participaram também 15 indivíduos eutróficos como grupo controle que são, alguns, pacientes do IAG, que foram submetidos à operação para correção de hérnia abdominal e, outros,

pacientes da Clínica de Ginecologia que, foram submetidas à histerectomia ou miomectomia, do mesmo hospital.

As coletas foram realizadas no período de março de 2011 a julho de 2012.

Os indivíduos do estudo estão em uma faixa de 27 a 55 anos de idade, sendo que, dentre os indivíduos obesos, 13 do sexo feminino e 3 do sexo masculino e dentre o grupo controle 12 são do sexo feminino e 3 do sexo masculino. Os pacientes foram divididos em 2 grupos pareados por faixa etária e sexo da seguinte forma:

Grupo Obeso metabolicamente normal (OMN): indivíduos com $IMC \geq 40\text{kg/m}^2$ (n=16)

Grupo Controle (CT): indivíduos com $IMC < 25\text{kg/m}^2$ (n=15)

Foram considerados critérios para exclusão: presença de doenças inflamatórias não relacionadas à obesidade, doentes em uso de medicação anti-inflamatória, tabagismo, portadores de urgências cirúrgicas, assim como de neoplasias ou doenças sistêmicas não compensadas. E os critérios de inclusão foram ausência de DM2, dislipidemias e/ou uso de medicamentos relacionados. Todos os indivíduos participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido para a participação.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) com o parecer de número 0608.0.203.000-10, e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG pelo processo nº: 176/10.

4.2-Avaliação do paciente

As medidas de peso, altura e composição corporal foram realizadas no dia da operação, com o paciente já hospitalizado. A altura e o peso foram aferidos em balança tipo plataforma. A avaliação da composição corporal foi feita pelo método de Bioimpedância (modelo Biodynamics 310e, marca TBW). Os parâmetros metabólicos séricos foram coletados no prontuário do paciente no dia da operação. Após a avaliação, foi feita investigação com o paciente para verificar fatores de exclusão e inclusão para o estudo.

4.3-Coleta de material

No momento da operação foram retirados, pelo cirurgião, fragmentos de tecido adiposo subcutâneo abdominal e visceral (omental). A retirada dos fragmentos foi realizada nas mesmas regiões anatômicas em todos os pacientes. Após retirados, os fragmentos de tecido adiposo foram acondicionados, uma parte em solução protetora de RNA (RNAholder- BIOAGENCY), para análises de RT-PCR dentre outras, e acondicionados em gelo e transferidos para o freezer -80°C para posteriores análises. Outra parte foi acondicionada em formol 10%, para posteriores análises histológicas. Foram coletados também 5mL de sangue no momento da punção do acesso, pelo anestesista. O sangue foi acondicionado em gelo e posteriormente centrifugado para a separação do soro, que também foi acondicionado em freezer -80°C para posteriores análises. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

4.4 Histologia do Tecido Adiposo

O tecido adiposo visceral e subcutâneo coletado foi lavado em solução salina e fixado em formol a 10%. Após 24h o tecido foi transferido para solução de etanol 70% e, posteriormente, foi feita inclusão em paraplast. Após a inclusão, foram feitos cortes de 7 μ m de espessura em micrótomo e montagem em lâminas de vidro. Cada lâmina continha 2-3 cortes retirados do bloco de paraplast com distância mínima de 20 μ m. As lâminas foram coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE). A análise foi feita em microscópio acoplado à câmera digital em um aumento de 100x. A área do adipócito foi calculada pelo valor médio de 100 adipócitos por indivíduo. Para estratificar adipócitos menores e maiores foi utilizado o ponto de corte menor ou igual a 6000 μ m² e maior ou igual a 10000 μ m² respectivamente conforme o estudo de (Villaret et al. 2010). Os cortes foram analisados com auxílio do software Image-Pro Plus versão 6.3 (Bethesda, Maryland - USA).

4.5-Dosagens de adipocinas no soro e tecido adiposo

Para a dosagem das adipocinas (leptina no soro, IL6, TNF, CCL2/MCP1, IL10, TGF β no soro e tecido adiposo) foi utilizado método ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) de captura. Foram utilizados 100 μ L de soro para o ensaio. Para análises em tecido adiposo foram utilizados 100mg de amostra homogeneizada em 1mL de solução para extração de proteínas (5% BSA em PBS estéril, pH 7,2; 0,017% fenilmetil sulfonil fluorida, 0,048% cloreto de benzetônio, 0,37% EDTA, 0,002% aprotinina). O homogenato foi centrifugado a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C. 100 μ L do infranadante resultante foi utilizado para o ensaio. Placas de 96

poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-humano leptina, TNF e IL6 e CCL2/MCP1, IL10, TGF β (BD OptEIA™ Biosciences) e incubadas *overnight* em câmara úmida em temperatura ambiente. Após este período os poços foram lavados por três vezes com água Tween 20® 0,05%. Posteriormente, a placa foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas com 100 μ L de solução de bloqueio (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) e incubada uma hora em temperatura ambiente. Terminado este prazo, os poços foram lavados, novamente, como descritos acima.

Após o bloqueio foram adicionados 100 μ L das amostras diluídas 1:2 em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) e colocadas novamente em câmara úmida e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas em duplicata e foram colocados 100 μ L de solução de diluição em um poço para caracterização do branco. Após este período as placas foram lavadas como descrito previamente.

Após a lavagem adicionaram--se 100 μ L do anticorpo de detecção anti-humano leptina, TNF e IL6 e CCL2/MCP1, IL10, TGF β previamente diluídos em reagente de diluição (1% BSA em PBS estéril, pH 7,2) em cada poço. A placa ficou incubada em temperatura ambiente por 1h. Os poços foram lavados novamente, como descritos acima. Posteriormente adicionaram-se 100 μ L de streptoavidina-HRP por poço. A placa ficou incubada no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este prazo, os poços foram lavados novamente, como descritos acima. Posteriormente, 100 μ L da solução de substratos (reagente de cor A-H₂O₂ e reagente de cor B-OPD 1:1) foram adicionadas por poço, seguidas da incubação de 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ por poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm. O resultado no soro foi expresso em pg por mL, e

no tecido adiposo em pg/ mg de proteína. A concentração de proteína do tecido adiposo dosada pelo método descrito por Lowry (Lowry et al. 1951). A razão entre IL6 e IL10 e TNF e IL10 foi calculada a partir dos resultados observados.

4.6-Quantificação dos níveis de RNAm para leptina, adiponectina, AdipoR1, IRS-1, GLUT4, TNF, CCL2/MCP1, IL6, IL10, TGF β , FOXP3 por meio da técnica *Real Time-PCR*

4.6.1-Extração de RNA total do tecido adiposo

A extração de RNA total do tecido adiposo foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 1mL do reagente TRIzol[®] foi colocado com 50 mg de tecido adiposo em microtubo Rnase *free*. Um homogenizador foi utilizado para a maceração dos tecidos. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A camada de gordura sobrenadante foi descartada. Em seguida foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e os microtubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos e deixados em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 13000 rpm, por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo que já continha 0,5mL de isopropanol. Os microtubos foram agitados manualmente por inversão por 1 minuto. As amostras foram deixadas aproximadamente por 30 minutos a -80°C para auxiliar a precipitação do RNA. Após esse tempo, os microtubos foram centrifugados novamente a 13.000 rpm, por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado à amostra 1 mL de álcool 75% seguida de mais uma centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi

emborcado em papel filtro e cerca de 5 a 10 minutos após, foram adicionados 30µL de água milli Q. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por 10 minutos para ajudar a dissolver o *pellet* de RNA. Passado esse tempo, as amostras foram mantidas a -80°C até posterior utilização.

4.6.2 Quantificação do RNA total

Após os procedimentos descritos anteriormente, uma alíquota de 2µL de RNA foi separada para determinação da concentração de RNA em ng/µL e para avaliação da pureza e integridade do RNA caracterizados pela relação de absorbância 260/280nm maior que 1,8. Para tais procedimentos foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop. Os dados foram analisados numa faixa de absorbância de 0,15 a 1,0nm.

4.6.3 Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa

A quantidade de 1µg de RNA total por amostra foi utilizada para a síntese e amplificação de cDNA. Para a fase de anelamento, um mix foi preparado com 0,5µL de Oligo dT 50µM + 1,25µL de água milli-Q por amostra. Após a adição do mix, as amostras foram colocadas no termociclador (PCR System 9700 Applied Biosystems) a 72°C por 5 minutos. Após a fase de anelamento, as amostras foram retiradas do termociclador e adicionadas a segundo mix contendo 2µL de MMLV tampão 5x + 0,5µL MMLV transcriptase reversa + 0,5µL dNTPs 10nM + 0,1µL de inibidor de RNase + 0,25µL de água milli-Q por amostra. Foram adicionados 3,25µL desse mix às amostras que foram novamente colocadas no termociclador para a fase de

transcrição. Nessa fase as amostras foram aquecidas 42°C por 3 horas e depois a 72°C por 15 minutos. O produto dessa reação estocado a -20°C para posterior utilização.

4.6.4-Amplificação de cDNA por *Real Time* PCR

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de *Real Time* PCR. Para tal foi utilizada microplaca de 96 poços específica para RT-PCR. Um mix contendo: 5µL de Sybr Green + 1µL de água milli-Q + 0,75µL do *reverse primer* (5µM) + 0,75µL do *forward primer* (5µM) por poço adicionado a 2,5µL de amostra de cDNA diluídos 1:10. Após a pipetagem, a microplaca foi selada com filme plástico próprio. A placa foi então colocada na máquina de RT-PCR (AbiPrism 7900HT-Applied Biosystems) e lida no programa SDS 2.0, programada para 35 ciclos de reação, com as seguintes etapas:

50°C -2 minutos

95°C- 10minutos

95°C -15 segundos

60°C - 1 minuto

95°C - 15segundos

60°C - 15segundos

O nível relativo de expressão gênica foi determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foi normalizado pela expressão de β -actina.

Quadro 1: Primers utilizados para o RT-PCR

Identificação	Forward Primer	Reverse Primer	ID/NCBI
AdipoR1	5- ACTATCGCTGAGGGCTTTGTCA-3	5-TAAAGGCCAGCTCCAGTGATGT-3	NM001127681
Adiponectina	5-AACCTGGAGAAGGTGCCTATGT-3	5-TACAGCCCAGGAATGTTGCAGT-3	NM004797.3
IRS1	5-TCACAGCAGAATGAAGACCTAAATG-3	5-TGAGTTAGAAGAGGATTTGCTGAGG-3	NM005544.2
GluT4	5-AGCTCTCTGGCATCAATGCTGT-3	5-ACAACACCGAGACCAAGGTGAA-3	NM001042.2
Leptina	5-GTTTGGACTTCATTOCTGGGCT-3	5-TGGATCACGTTTCTGGAAGGCA-3	NM000230.2
TNF	5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACA-3'	5'-GGGTCAGTATGTGAGAGGAAGA-3'	NM000594.3
CCL22	5'-TCATAGCAGCCACCTTCATTC-3'	5'-CTCTGCACTGAGATCTTCCTATTG-3'	NM002982.3
IL6	5'-GGAGACTTGCCTGGTGAAA-3'	5'-CTGGCTTGTTCTCACTACTC-3'	NM000600.3
IL10	5'-TGTCATCGATTTCTTCCCTGT-3'	5'-GGCTTTGTAGATGCCTTTCTCT-3'	NM000572.2
Tgf β	5'-TTGATGTCACCGGAGTTGTG-3'	5'-TCCACTTGCAGTGTGTTATCC-3'	NM000660.4
Foxp3	5-CACGCATGTTTGCCTTCTTC-3	5-CTTGTGCAGACTCAGGTTGT-3	NM014009
β -actina	5-ATCCCCCAAAGTTCACAATG-3	5-GTGGCTTTTAGGATGGCAAG-3	NM001101.3

Fonte: NCBI

4.7 - Determinação da expressão proteica das MMPs 2, 8 e 9 por *Western blot*

O tecido adiposo subcutâneo e o visceral congelados a -80°C foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi[®], Brasil) em presença de tampão de lise HNTG (HEPES 50 mmol/L; NaCl 150 mmol/L; Triton[®]X-100 1%; glicerol 10%) acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast[®], Sigma) em proporção de 50 mg de tecido para 200 μL de tampão de

lise. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante removido da fase inferior à camada de gordura foi aliquoteado e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Para separação eletroforética, foram aplicados 30 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 12%. Após serem separadas no gel de poliácridamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45µm. A qualidade da transferência foi monitorada pela coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween: Tris-HCl 50mmol/L; NaCl 150 mmol/L; Tween®20 0,1%) contendo 4% de albumina. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8°C), com o anticorpo primário específico diluído em 4% de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-MMP-2 (1:1000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-MMP-8 (1:2000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-MMP-9 (1:2000; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA) e anti β-actina (1:3000; monoclonal feito em camundongo; Millipore®). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-Tween por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, anti-goat IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, St.Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em

TBS-Tween (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica pelo software ImageJ 1.40g. Os resultados obtidos das análises das MMPs foram normalizados pelo conteúdo de cada amostra em β -actina. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD[®], CA, USA).

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a definição do número da amostra foi realizado o cálculo amostral de acordo com Armitage & Berry (1987). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição dos resultados. Para detectar diferenças entre os grupos e tecido adiposo foi feito ANOVA *oneway* e pós-teste de Tukey para distribuição normal, e Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para distribuição não normal, para avaliar somente os grupos foi utilizado test t pareado. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão. Para analisar as correlações foram utilizados teste de correlação de Pearson e Spearman para distribuição normal e não normal respectivamente. Foi utilizado o teste de Grubbs para detecção de *outliers* no caso de distribuição normal, e o teste Boxplot para os demais. Nível de significância estatística de 5% foi estabelecido. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6- RESULTADOS

6.1- Peso, IMC, % de gordura corporal e parâmetros metabólicos séricos

Os pacientes obesos (OMN) apresentaram peso, IMC, e % de gordura elevado em relação aos controles (CT), como esperado. O peso dos OMN foi aproximadamente o dobro dos CT. A mesma razão foi encontrada em relação ao IMC (**Tabela 1**). O percentual de gordura corporal foi significativamente maior nos OMN numa proporção de aproximadamente 160% em relação aos controles. As alterações metabólicas típicas da obesidade estavam ausentes nos pacientes obesos, com exceção da hipertensão arterial sistêmica (HAS) presente em cinco pacientes. Embora cinco pacientes obesos apresentassem HAS leve, não houve diferenças nos resultados dos parâmetros analisados entre obesos com ou sem hipertensão.

Tabela 1: Peso, IMC, % gordura corporal e, parâmetros metabólicos séricos de indivíduos controles e OMN

PARÂMETRO	CONTROLE	OMN
Peso Corporal (kg)	62,4 ± 1,9	132,6 ± 4,5*
IMC (kg/m ²)	23,7 ± 0,5	51,2 ± 1,0*
% Gordura Corporal	29,9 ± 2,0	48,5 ± 0,9*
Glicemia de jejum (mg/dL)	87,5 ± 1,8	86,6 ± 2,7
Insulina (mg/dL)	-	20,6 ± 4,9
HOMA-IR	-	3,6 ± 0,6
Hemoglobina Glicada (%)	-	5,8 ± 0,2
Pressão Sistólica (mmHg)	122,7 ± 2,0	125,4 ± 1,8
Pressão Diastólica (mmHg)	81,6 ± 0,9	86,1 ± 1,4
Colesterol HDL(mg/dL)	66,3 ± 10,7	45,42 ± 2,4*
Colesterol LDL (mg/dL)	110,0 ± 7,8	116,9 ± 5,3
Triglicerídeos	112,0 ± 14,8	143,3 ± 19,1
Ácido Úrico (mg/dL)	-	5,9 ± 0,9

Resultados expressos em média ± erro padrão. Teste t pareado; * p <0,05

6.2-Área do Adipócito

A área do adipócito do tecido adiposo subcutâneo e visceral foi maior nos indivíduos OMN quando comparada com os depósitos correspondentes no grupo CT. No tecido adiposo subcutâneo foi observada área do adipócito do indivíduo OMN aproximadamente 65% maior que o do indivíduo CT. Diferença ainda maior foi encontrada no adipócito visceral do OMN cuja área foi aproximadamente 85% maior em relação ao CT (**Figura 1**). Quando comparada a área do adipócito nos diferentes depósitos, subcutâneo e visceral, dentro do mesmo grupo, não foi encontrada diferença estatística (**Figura 1**).

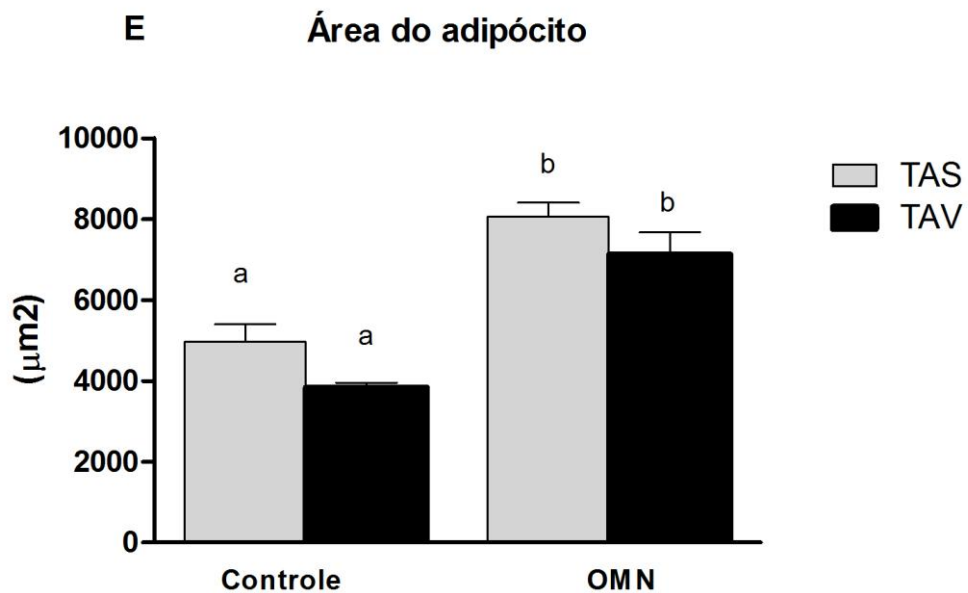
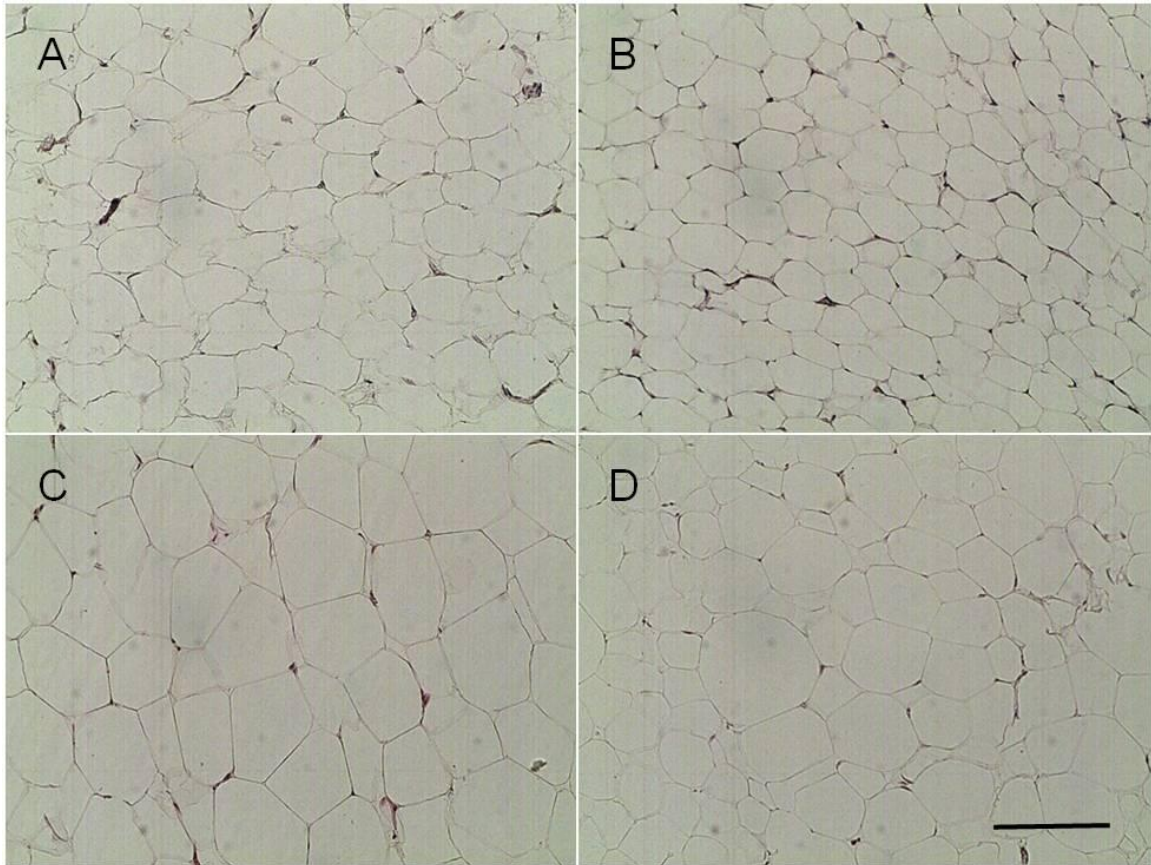


Figura 1 – Histologia do tecido adiposo- TAS Controle (A), TAV Controle (B), TAS OMN (C), TAV OMN (D), Área do Adipócito do TAS e TAV dos dois grupos. Imagem com 100x de aumento. Barra indica 100µm. Área do adipócito dos dois grupos (E). Barras representam média e linhas verticais representam erro padrão; Teste ANOVA oneway/pós-teste Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

Quando avaliado o tamanho da área do adipócito dos diferentes tecidos adiposos de OMN, foi observado um padrão diverso entre o TAS e o TAV. No TAS há o dobro de adipócitos maiores que $10000\mu\text{m}^2$ em relação ao TAV. E no TAV praticamente o inverso é encontrado quando avaliados adipócitos menores, ou seja, foi observado mais de 40% dos adipócitos do TAV menores que $6000\mu\text{m}^2$ (**Tabela 2**)

Tabela 2 - Área de adipócitos no TAS e TAV

	CONTROLE		OMN	
	TAS	TAV	TAS	TAV
Adipócitos $\leq 6,000\mu\text{m}^2$ (%)	73,0 \pm 5,96	92,5 \pm 2,19 ^a	26.8 \pm 4.4 ^b	41.1 \pm 7. 64 ^b
Adipócitos $\geq 10,000\mu\text{m}^2$ (%)	1,0 \pm 0,5	0,5 \pm 0,4	20.9 \pm 3.96 ^b	10.9 \pm 2.59 ^{ab}

Resultados expressos em média \pm erro padrão. Teste t pareado ^a diferença entre depósitos dentro do mesmo grupo; ^b diferença entre grupos

6.3 Leptinemia e expressão de leptina no tecido adiposo

Os indivíduos OMN apresentaram concentração sérica de leptina aproximadamente duas vezes maior que os indivíduos controle (**Figura 2**). A leptinemia foi correlacionada com peso, IMC, e percentual de gordura, como descrito na literatura (dados não mostrados). A leptinemia não teve correlação com a área do adipócito do tecido adiposo subcutâneo, embora evidenciado $p=0,08$, e também não houve correlação com a área do adipócito do tecido adiposo visceral.

Foi encontrada expressão de RNAm da leptina aumentada no tecido adiposo subcutâneo no grupo OMN em relação ao Controle, o que não ocorreu no tecido adiposo visceral onde no geral, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (**Figura 2**). Entretanto, no tecido adiposo subcutâneo de OMN foi evidenciada expressão significativamente maior em relação ao tecido visceral do mesmo grupo. Resultado similar não foi encontrado no grupo controle que não possui diferença estatística na expressão de leptina entre os dois depósitos (**Figura 2**).

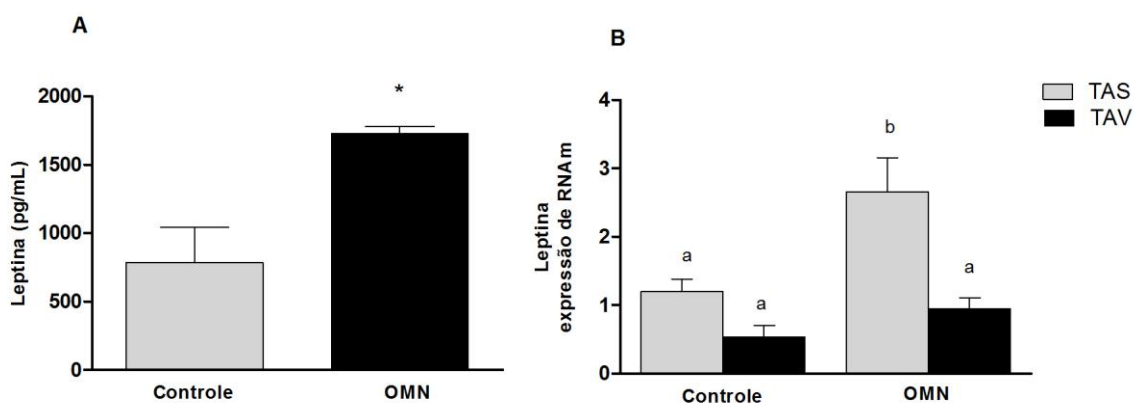


Figura-2 - Leptina sérica (A) e Expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo (B). Barras representam médias e linhas verticais representam erro padrão. * e letras diferentes indicam diferença estatística com $p < 0,05$. (A) Teste t pareado e (B) ANOVA oneway/ pós-teste deTukey

6.4- Expressão de Adiponectina e o receptor AdipoR1 no tecido adiposo

A expressão de adiponectina foi estatisticamente semelhante no tecido adiposo subcutâneo e visceral dos indivíduos controles. Porém, no tecido adiposo subcutâneo do grupo controle a expressão de adiponectina foi maior que os dois depósitos nos indivíduos OMN, que por sua vez foi observada expressão semelhante ao visceral no grupo controle (**Figura 3**). No grupo OMN, não houve

diferença significativa na expressão de adiponectina entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral (**Figura 3**). A expressão do receptor de adiponectina, AdipoR1, não foi diferente entre os grupos, bem como entre o TAS e TAV (**Figura 3**).

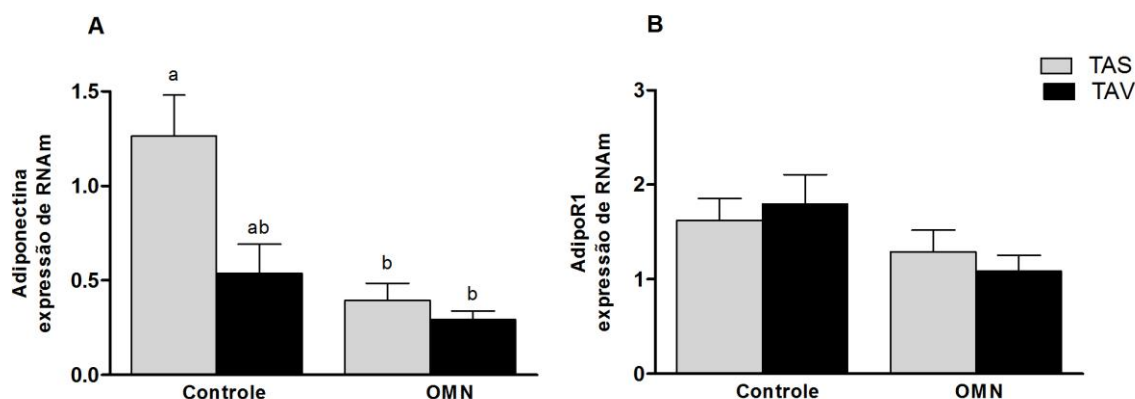


Figura 3 - Expressão de RNAm de Adiponectina (A) e AdipoR1 (B) no tecido adiposo. Barras representam médias e linhas verticais representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística com $p < 0,05$. Teste Kruskal Wallis/ pós-teste Dun

6.5- Expressão de IRS1 e GLUT4 no tecido adiposo

No grupo controle foi evidenciada expressão maior de GLUT4, no tecido adiposo subcutâneo em relação ao visceral (**Figura 4**). Nos OMN, ocorreu redução significativa da expressão desse transportador no tecido subcutâneo, fazendo com que a expressão nesse tecido fosse similar aos níveis observados no tecido visceral.

O padrão de expressão de IRS1 foi semelhante entre indivíduos de ambos os grupos e, ao contrário de GLUT4, não sofreu alterações no tecido subcutâneo em consequência à expansão do tecido (**Figura 4**).

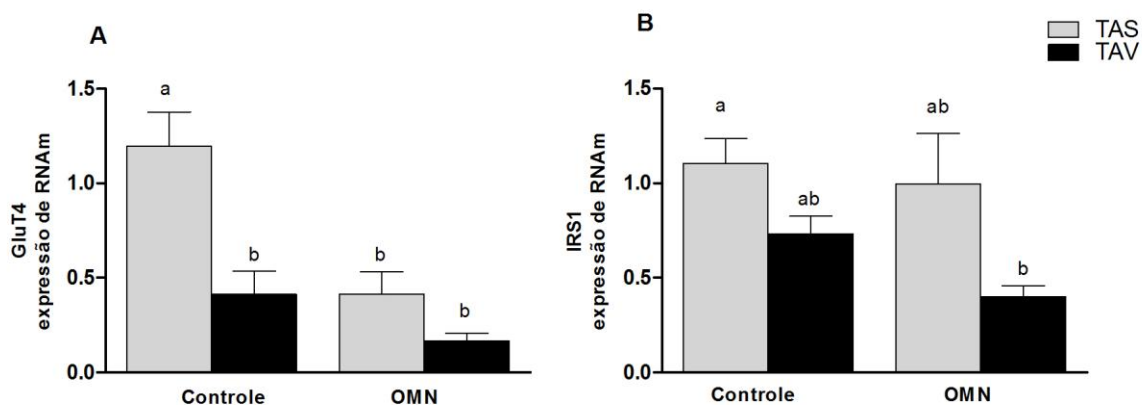


Figura 4- Expressão de RNAm de GLUT4 (A) e IRS1 (B) no tecido adiposo. Barras representam médias e linhas verticais representam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística com $p < 0,05$. ANOVA oneway/ pós-teste Tukey.

6.6- Concentração sérica, expressão de RNAm e secreção de adipocinas proinflamatórias no tecido adiposo

Apesar do maior peso, IMC e adiposidade (**Tabela 3**), os indivíduos OMN apresentaram níveis séricos das citocinas proinflamatórias IL6, TNF e MCP1/CCL2 semelhantes aos grupo controle (**Tabela 3**).

Tabela 3- Citocinas proinflamatórias séricas (IL6, TNF e CCL2) do grupo Controle e OMN

Adipocina (pg/mL)	Controle	OMN
IL6	26,86 ± 3,58	26,95 ± 1,91
TNF	125,8 ± 9,97	118,2 ± 8,52
CCL2	229,5 ± 19,3	310,8 ± 40,7

Teste t pareado. Sem diferença estatística em todos os testes

A expressão e a concentração dessas adipocinas inflamatórias foram também semelhantes quando os diferentes depósitos do tecido adiposo ou os

grupos foram considerados (**Figura 5**). Esses dados sugerem que, diferentemente de indivíduos obesos desregulados, não há maior produção dessas moléculas inflamatórias pelo tecido adiposo em obesos metabolicamente normais.

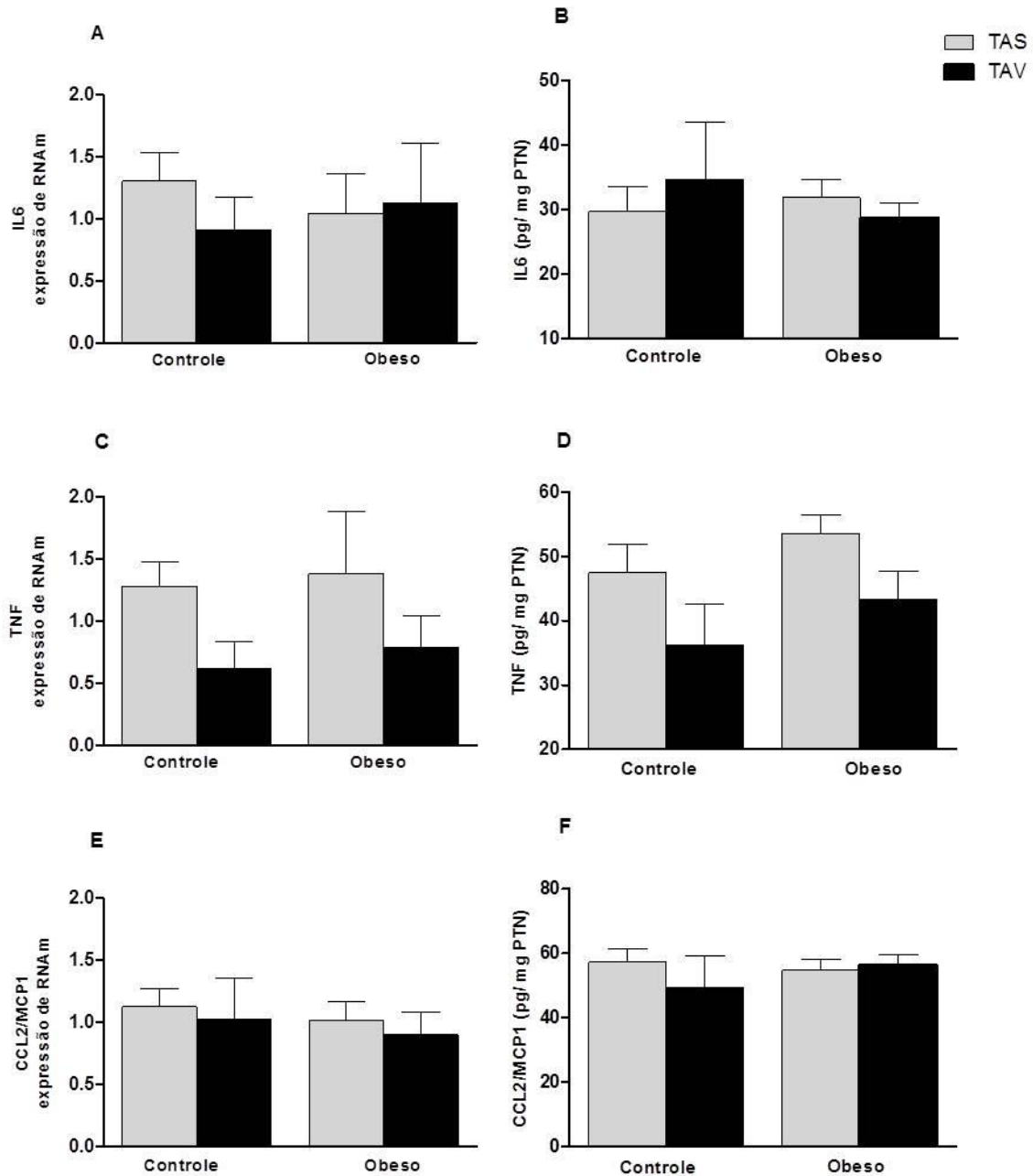


Figura 5 - Expressão de RNAm e Secreção de adipocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo IL6 (A e B), TNF (C e D), CCL2/MCP1 (E e F). Barras representam média e linhas verticais representam erro padrão. Sem diferença estatística em todos os testes. ANOVA oneway/ pós-teste Tukey

6.7 Concentração sérica, expressão de RNAm e secreção de adipocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo

Em relação às adipocinas regulatórias (anti-inflamatórias), foi evidenciado aumento de IL10 circulante e também da expressão no tecido adiposo em OMN, especialmente no subcutâneo, onde a diferença foi estatisticamente significativa em relação ao controle. A concentração de IL10, porém, foi similar em OMN e eutróficos, independente do tecido estudado (**Figura 6**). O TGF β teve a concentração sanguínea estatisticamente semelhante nos OMN e eutróficos (**Figura 6**). Entretanto, os dados de RT-PCR mostraram padrão de expressão semelhante ao IL10, ou seja, maior no tecido adiposo de obesos, principalmente no TAS, em relação aos controles (**Figura 6**). Quanto à concentração nos tecidos visceral e subcutâneo, foi observado que há nos indivíduos controles, maior quantidade de TGF β no tecido visceral em relação ao subcutâneo. Esse padrão não foi visto em OMN cuja concentração de TGF β foi similar nos dois sítios de tecido adiposo (**Figura 6**).

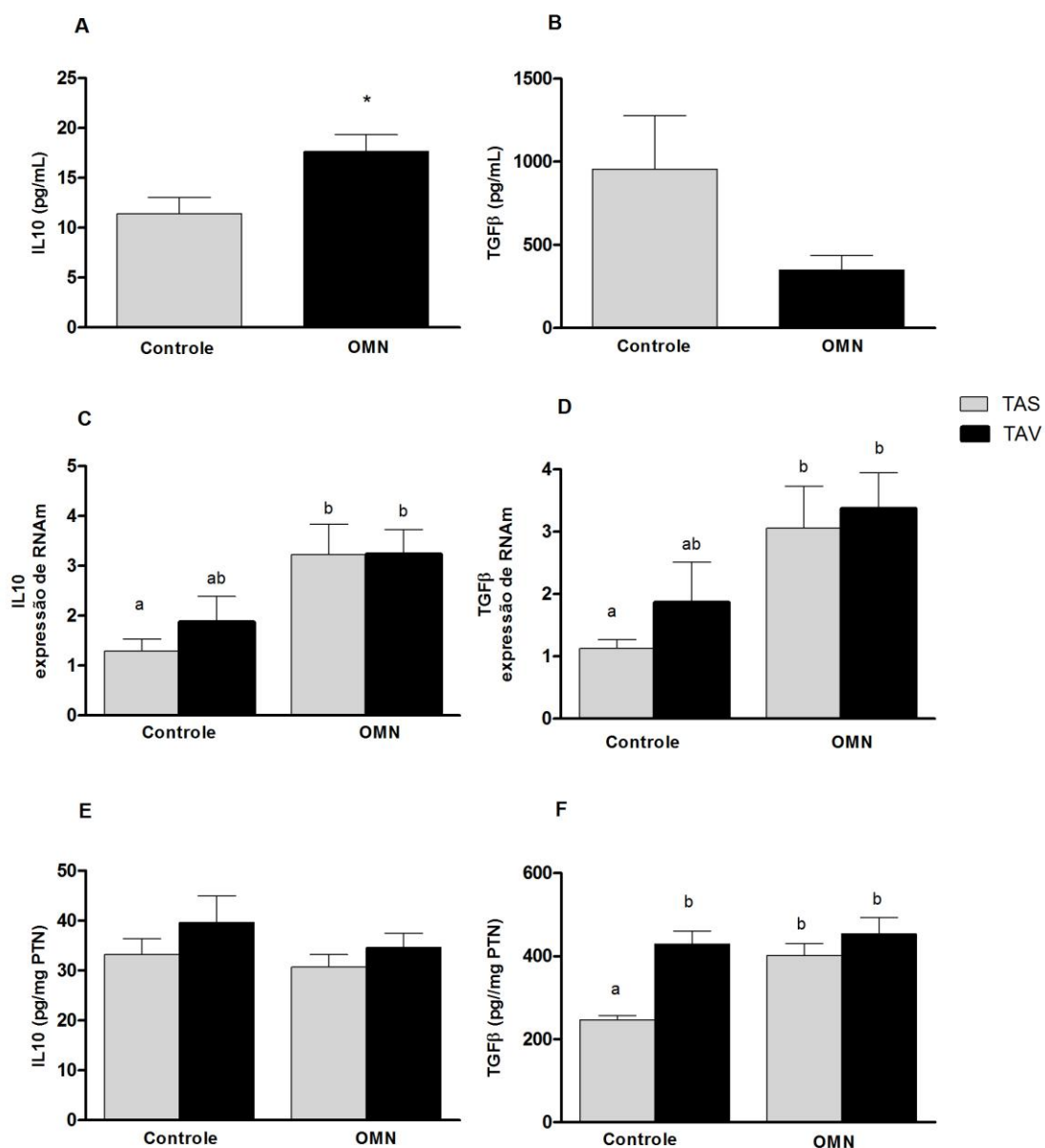


Figura 6- Níveis séricos (ELISA), expressão de RNAm (RT-PCR) e concentração (ELISA) de adipocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo IL10 (A, C e E respectivamente), TGFβ (B,D e F respectivamente). Barras representam médias e linhas verticais representam erro padrão. Teste t e ANOVA oneway e pós-teste Tukey. Letras diferentes significam diferença estatística, $p < 0,05$

6.8- Razão e correlação entre concentração de adipocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo

A intensidade da ação e o equilíbrio entre adipocinas pró e anti-inflamatórias foram avaliadas pela razão entre IL6/IL10 e TNF/10. Não foram observadas diferenças na razão entre IL6/IL10 (**Figura 7**). A razão TNF/IL10 revelou um perfil mais inflamatório em obesos do que em controles e no tecido adiposo subcutâneo comparado ao visceral (**Figura 7**). O efeito de IL10 na modulação dessas adipocinas pró-inflamatórias foi evidenciado pela correlação positiva de IL10 com IL6 e também com TNF no TAS de OMN (**Figura 7**).

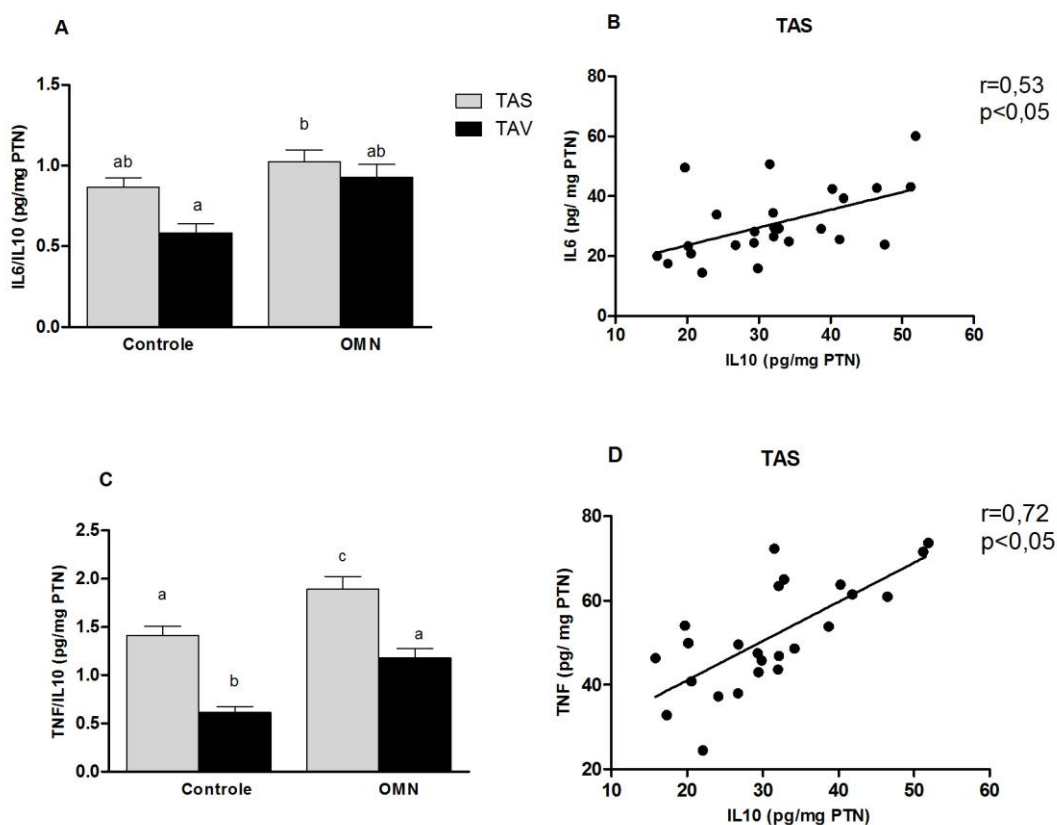


Figura 7: Razão entre concentração de adipocinas no tecido adiposo subcutâneo e visceral e correlação entre adipocinas no tecido adiposo subcutâneo de OMN. IL6 e IL10 (A, B), TNF e IL10 (C, D). Barras representam médias e linhas verticais representam erro padrão. Teste ANOVA oneway e pós-teste Tukey. Letras diferentes significam diferença estatística, $p<0,05$ (A e C). Correlação de Spearman (C e D)

6.9- Expressão de FOXP3 no tecido adiposo e correlação com diversos fatores

A expressão de FOXP3, regulador central para o desenvolvimento e função das células T reguladoras, foi avaliada. Foi observado que o tecido adiposo subcutâneo de OMN teve a expressão de FOXP3 aumentada em relação aos demais grupos (**Figura 8**). Essa maior expressão de FOXP3 no TAS de OMN, porém, não se correlacionou com a expressão de TGF β , ou IL10. Interessantemente, apenas no TAV de OMN houve uma correlação positiva da expressão de FOXP3 com a expressão de IL6 e TNF (**Figura 8**)

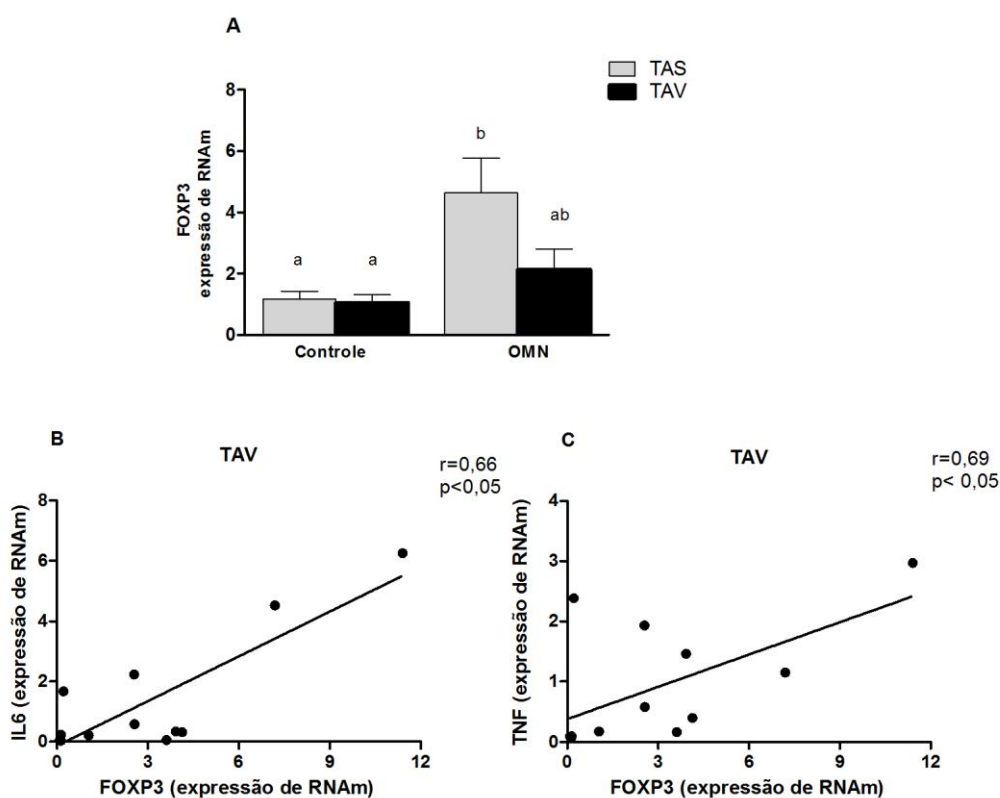


Figura 8 - Expressão de RNA por RT-PCR de FOXP3 no tecido adiposo (A) e Correlação entre FOXP3 e IL6 e TNF no tecido adiposo visceral de obesos (B e C). Dados expressos em média \pm erro padrão. Teste ANOVA oneway e pós-teste Tukey (A). Letras diferentes significam diferença estatística, $p<0,05$. Correlação de Spearman (B e C)

Ao correlacionar as variáveis que caracterizam a obesidade, como peso, IMC e percentual de gordura, com a expressão de FOXP3 no tecido adiposo, foram observadas relações significativas nos diferentes tecidos nos indivíduos OMN (**Tabela 4**). A expressão de FOXP3 no TAS correlacionou-se positivamente com peso ($p=0,08$) e IMC ($p<0,05$). Já a expressão de FOXP3 no TAV não teve correlação com peso, porém foi significativamente relacionada com IMC e % gordura corporal ($p<0,05$).

Tabela 4 - Coeficiente de correlação estatisticamente significativa entre expressão de FOXP3 e dados antropométricos de indivíduos OMN

		Peso Corporal	IMC	% Gordura corporal
FOXP3	TAS	0,54	0,68	NS
	TAV	NS	0,61	0,61

Coeficientes de correlação de Spearman com diferença estatística ($p<0.05$). NS=não significativo

6.10- Expressão de metaloproteinases de matriz no tecido adiposo

Para confirmar o papel da remodelagem do tecido adiposo na regulação da inflamação e no controle da resistência à insulina, foram investigadas as alterações na matriz extracelular por meio da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) 2, 8 e 9. Foi observado que a MMP2 foi semelhante no TAS entre os dois grupos, entretanto em OMN o TAV apresentou expressão maior em relação ao TAS no mesmo grupo e em relação ao TAV no grupo controle. No grupo controle não foi observada diferença na expressão de MMP2 entre os dois depósitos (**Figura 9**). Quando avaliada a MMP8, também foi observada padrão semelhante de expressão

no TAS entre os dois grupos, e o mesmo acontece no TAV. Entretanto nos OMN o TAV apresentou expressão aumentada em relação ao TAS. Porém no grupo controle a expressão de MMP8 foi semelhante no TAS e no TAV (**Figura 9**). Em relação à MMP9, ficou evidenciado que tanto nos obesos quanto nos controles, a expressão foi semelhante nos dois depósitos, entretanto a expressão de MMP9 foi maior no TAV de OMN quando comparado o mesmo depósito no grupo controle. Porém, no TAS, a expressão foi semelhante entre os dois grupos (**Figura 9**).

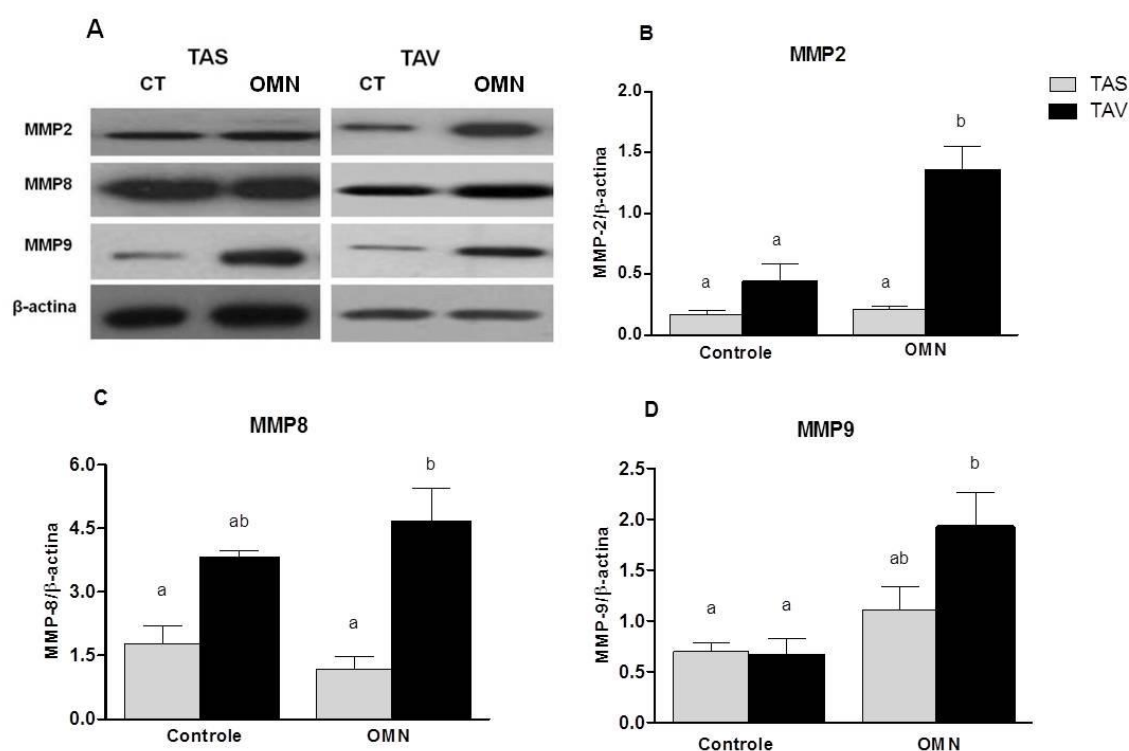


Figura 9: Expressão de metaloproteinases (MMPs) por Western blot no tecido adiposo (A) MMP2 (B), MMP8 (C), MMP9 (D). Dados expressos em média \pm erro padrão. Teste ANOVA oneway e pós-teste Tukey. Letras diferentes significam diferença estatística, $p < 0,05$

Quando avaliada a relação das MMPs com indicadores de obesidade e fatores reguladores de inflamação foram encontradas diferentes correlações em diferentes tecidos de OMN (**Tabela 5**)

Tabela 5 - Coeficiente de correlação entre MMPs e gordura corporal e TGF β de indivíduos OMN

	MMP2		MMP8		MMP9	
	TAS	TAV	TAS	TAV	TAS	TAV
% gordura corporal	NS	NS	0,91	NS	NS	NS
TGFβ (ng/mg PTN)	1,0	0,94	NS	NS	NS	NS

Correlação de Pearson (distribuição normal) e Spearman (distribuição não normal); NS=não significativo

7- DISCUSSÃO

No presente estudo foi analisado o perfil de expressão e secreção de adipocinas no tecido adiposo subcutâneo e visceral de indivíduos obesos grau III metabolicamente normais (OMN) comparados como de indivíduos eutróficos (controle). Foi observado que nos indivíduos obesos, mesmo sem importantes alterações no metabolismo, a expressão de leptina, especificamente no tecido adiposo subcutâneo e a leptinemia estão aumentadas em relação aos indivíduos controle. Está bem descrita a relação entre a leptina com peso, IMC, adiposidade e área do adipócito (Morrison et al. 2009; Zuo et al. 2013). Foram encontradas correlações entre expressão de leptina no TAS e os indicadores de obesidade citados acima, entretanto para a área do adipócito a correlação não foi

estatisticamente significativa evidenciando um p de 0,08. Em relação à leptinemia ou expressão de leptina no tecido adiposo visceral, não foi demonstrada nenhuma correlação significativa. Curiosamente no tecido adiposo subcutâneo de OMN ficou evidenciado praticamente o dobro do número de adipócitos maiores que 10000 μm^2 quando comparado com o TAV, consistente com os dados de (Villaret et al. 2010). Provavelmente essa característica está relacionada às diferenças encontradas entre os depósitos de tecido adiposo nos OMN, principalmente em relação à expressão de metaloproteinases.

A expressão aumentada das MMPs encontrada no TAV de OMN pode ser favorável à adipogênese, por influenciar maior angiogênese (Lemoine et al. 2013). Portanto maior quantidade de adipócito menores, talvez possa ser indicativa de adipócitos novos. A adiposidade teve correlação com expressão de leptina no TAS, porém não foi encontrada relação entre leptinemia e tamanho do adipócito. Com isso é possível sugerir que a quantidade de massa de tecido adiposo tem maior influência na produção de leptina em relação à área do adipócito.

O papel da leptina na regulação da composição corporal está bem estabelecido em roedores, entretanto em humanos, muitas questões ainda não estão claras. A administração de leptina recombinante não induz perda de peso em obesos sugerindo que esses indivíduos sejam resistentes à ação da leptina (Oswal & Yeo 2010). Associação entre concentrações séricas de leptina e eventos cardiovasculares tem sido observada, mas os resultados ainda não são uniformes (Singh et al. 2010). Apesar dos indivíduos OMN do nosso estudo apresentarem leptinemia aumentada, ainda mantém um perfil metabólico que não aponta para risco cardiovascular o que pode evidenciar necessidade de influência de outros fatores associados à leptinemia no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Adicionalmente, não foi encontrada correlação da leptinemia ou expressão de leptina com as citocinas pró-inflamatórias investigadas, que não estão elevadas nos OMN. Esse dado pode indicar que a leptinemia ou expressão aumentada de leptina de forma isolada tenha influência mais discreta no desenvolvimento do estado inflamatório descrito em indivíduos obesos, assim como nas consequências dessa inflamação.

Foi demonstrado por Zuo et al. (2013) a associação entre leptinemia e resistência à insulina em chineses independente do grau de adiposidade, apontando o risco cardiovascular da hiperleptinemia mesmo não relacionada ao peso. A ausência do diabetes ou outras desordens metabólicas nos OMN do nosso estudo foi caracterizada pelo perfil sérico avaliado. Apesar da ausência de indicadores de DM2, os OMN apresentaram expressão de adiponectina menor no tecido adiposo principalmente em relação ao TAS dos indivíduos controle. Porém dentro do grupo OMN não houve diferença na expressão de adiponectina entre os diferentes depósitos de tecido adiposo. Esse mesmo padrão foi encontrado quando avaliada a expressão de GLUT4. Quando avaliados o AdipoR1 e o IRS-1 não foram encontradas alterações relevantes nem entre os grupos e nem entre os depósitos de tecido adiposo dentro dos grupos.

Sabe-se que a adiponectina é importante para melhora da sensibilidade à insulina, é anti-inflamatória e tem ação antiaterosclerose (Simpson & Whitehead 2010). Foi observado nos obesos o HOMA médio de 3,6. De acordo com Hardy et al. (2011) HOMA maior que 2,4 caracteriza resistência à insulina. Entretanto uma grande variação no ponto de corte utilizado para caracterizar resistência à insulina por meio do índice HOMA é encontrada em diferentes estudos (Primeau et al. 2011). Apesar do índice HOMA encontrado e da expressão reduzida de adiponectina e

Glut4 no tecido adiposo dos OMN, a glicemia e a hemoglobina glicada estão normais. Diante desses resultados é possível supor que o metabolismo de glicose possa estar alterado, mas que a secreção de insulina ainda é suficiente para manter os níveis séricos dentro da normalidade. Além disso, não foram observadas alterações inflamatórias relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, como aumento de adipocinas pró-inflamatórias e indicativos de infiltrado de macrófagos. Entretanto, a adiponectina estava reduzida e esta tem relação com a resistência à insulina.

Embora a inflamação nem sempre seja necessária para o desenvolvimento da resistência à insulina no tecido adiposo, a resistência à insulina em muitos indivíduos obesos é precedida por aumento na infiltração de macrófagos e produção de citocinas no tecido adiposo (Xu et al. 2013). Portanto mesmo com alguns fatores desfavoráveis em termos de equilíbrios de adipocinas, como aumento da leptina e redução da adiponectina, é importante considerar que esses indivíduos ainda apresentam regulação metabólica que pode ser atribuída a outros fatores.

Foi observado que nos OMN do nosso estudo ocorrem algumas alterações favoráveis no equilíbrio de adipocinas pró e anti-inflamatórias. Essa característica pode estar envolvida no melhor perfil metabólico desses indivíduos. Interessantemente, não foram encontradas diferenças nos níveis circulantes ou na expressão e secreção das adipocinas pró-inflamatórias IL6, TNF e CCL2/MCP1 entre os indivíduos OMN e controles, e nem mesmo entre os depósitos de tecido adiposo subcutâneo e visceral.

Evidências indicam que o estado de inflamação crônica de baixo grau característico da obesidade está implicado na patogênese de várias doenças crônicas, como DM2, hipertensão, aterosclerose, dentre outras desordens

metabólicas (Ouchi et al. 2011; Ye 2013). De fato, mudanças inflamatórias, como o desequilíbrio entre a produção de adipocinas anti e pró-inflamatórias, visto principalmente na obesidade visceral, contribui criticamente para o desenvolvimento de alguns aspectos da síndrome metabólica (Bigornia et al. 2012; Suganami et al. 2012). Um mecanismo importante na patogênese da resistência à insulina associada à obesidade refere-se à inflamação no tecido adiposo que tem sido bem demonstrada em modelos animais e agora está ganhando reconhecimento na doença humana. (Bigornia et al. 2012).

No nosso estudo, podemos hipotetizar que a falta de aumento nas adipocinas pró-inflamatórias seja uma das razões da manutenção do estado metabólico normal nesses pacientes, tornando-os mais semelhantes aos indivíduos eutróficos. Hardy, et al. (2011) investigando o perfil de expressão gênica do tecido adiposo subcutâneo e omental de indivíduos obesos grau III sensíveis e resistentes à insulina, encontraram maior expressão de quimiocinas e infiltrado de macrófagos somente no TA omental daqueles obesos resistentes à insulina, correlacionando esses fatores pró-inflamatórios somente com a resistência à insulina e não com o IMC. No nosso estudo não foram encontradas expressão ou secreção aumentada de CCL2/MCP1 nos obesos indicando não haver o estímulo para a maior infiltração de macrófagos tipo M1 (pró-inflamatórios) no tecido adiposo desses indivíduos.

Sabe-se que sob condições normais o tecido adiposo apresenta ambiente anti-inflamatório, e que macrófagos residentes no TA apresentam fenótipo anti-inflamatório ou estado alternativamente ativado (M2), produzindo fatores como IL10 e TGF β (Cipolletta et al. 2011). Portanto optamos por investigar também a produção das adipocinas anti-inflamatórias e regulatórias IL10 e TGF β . Em nosso estudo foi observada expressão aumentada de IL10 no tecido adiposo subcutâneo e visceral

dos obesos em relação aos controles, além da maior concentração de IL10 no sangue de OMN. A IL10, produzida por diversas células imunes tem papel imunorregulatório, suprimindo respostas imunológicas prejudiciais, como produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Gotoh et al. 2012). O estudo de Hong et al. (2009), demonstrou que camundongos transgênicos que superexpressam IL10 especificamente no músculo, tornam-se protegidos da resistência á insulina induzida por dieta, com níveis reduzidos de macrófagos e citocinas pró-inflamatórias.

Baixos níveis séricos de IL10 estão associados com a síndrome metabólica em mulheres independente da idade e do peso corporal, ou seja, capacidade reduzida na produção de IL10 pode identificar obesos propensos ao desenvolvimento de desordens metabólicas, provavelmente devido ao efeito supressor da IL10 que está envolvido na inibição da produção de TNF e IL6 (Esposito et al. 2003; Hong et al. 2009). Dessa forma, o aumento de IL10 nos OMN do nosso estudo sugere a formação de resposta regulatória maior nesses indivíduos, concorrendo para a manutenção mais baixa dos níveis das adipocinas pró-inflamatórias e as repercussões na obesidade.

Esse papel regulatório de IL10 em resposta aos níveis de IL6 e TNF fica evidente pela correlação positiva da IL10 com IL6 e TNF no TAS de obesos e também de eutróficos. O equilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias foi também avaliado pela razão IL6/IL10 e TNF/IL10. Essas razões foram maiores nos tecidos de obesos, sugerindo que, a despeito da maior produção de IL10, ainda ocorre polarização do perfil pró-inflamatório, no que diz respeito especificamente a essas adipocinas. Porém outros fatores podem estar envolvidos na ausência de desordens metabólicas nos OMN do nosso estudo.

Além da IL10, investigamos também o TGF β e a expressão gênica de FOXP3 como indicador da presença de células T reg. FOXP3⁺, a fim de elucidar melhor o perfil do tecido adiposo de OMN. Sabe-se que a indução de fatores supressores como IL10 e células T reguladoras FOXP3⁺ é mediada pelo TGF β cuja função ainda não está totalmente clara na obesidade (Maynard et al. 2009).

A expressão de TGF β correlaciona-se positivamente com obesidade em estudos com humanos e modelos animais, e paradoxalmente *in vitro*, inibe a adipogênese pela via de sinalização SMAD (Cristancho & Lazar 2011). De acordo com Zamani & Brown (2011) o TGF β estimula a proliferação de préadipócitos e inibe a maturação destes em adipócitos maduros em cultura de células 3T3-L1. A expansão da massa de préadipócitos pelo TGF β , sem promover a diferenciação, pode ser uma ação regulatória mantendo população celular não diferenciada em ambiente rico em calorias, e também restringindo a diferenciação (Zamani & Brown 2011).

Fink et al. (2013) avaliaram a expressão de TGF β muscular em indivíduos magros, obesos com tolerância normal à glicose e obesos diabéticos, e encontraram expressão reduzida de TGF β nos diabéticos em relação aos obesos, além de correlação negativa com HbA1c e glicemia de jejum, apontando para efeito positivo do TGF β na sensibilidade à insulina. Já em indivíduos hipertensos não tratados, foi encontrada expressão reduzida de TGF β no TAS e TAV em relação ao grupo controle sem HAS, apontando para o provável papel protetor do TGF β também na HAS (Madec et al. 2010).

Encontramos aumento na expressão e secreção de TGF β no TAS e TAV dos obesos, o que provavelmente influencia o perfil metabólico desses indivíduos e ausência de DM2. Resultado similar foi encontrado por Fain et al. (2005), que

também demonstraram correlação positiva entre TGF β e IMC e % de gordura corporal. Vários tipos celulares em roedores e humanos podem produzir e/ou responder ao TGF β , que tem sido reconhecida como citocina com papel crítico na resposta imune reguladora. Dentre as funções descritas para o TGF β está o efeito inibitório no crescimento e ativação de células imunológicas, potente neutralização da ativação de macrófagos, prevenção na ativação de células dendríticas e supressão da ativação e proliferação de células T (Chen & Konkel 2010).

Adicionalmente, o TGF β é uma citocina chave para a expressão do gene FOXP3 em células T naive via TCR (Maruyama et al. 2011). A expressão de FOXP3 está maior no TAS de OMN em relação aos dois depósitos no grupo controle, porém, no TAV de OMN têm expressão numericamente maior em relação ao grupo controle, entretanto, sem diferença estatística. Células com fenótipo potencialmente regulatório tem sido previamente associadas com obesidade, como as células T natural killer, bem como as citocinas anti-inflamatórias IL10 e TGF β detectadas no tecido adiposo (Feuerer et al. 2009). Nesse contexto é importante investigar a influência de células T reg. FOXP3⁺ na regulação da inflamação na obesidade.

Van der Weerd et al. (2012) fizeram análise detalhada do compartimento de células T no sangue de indivíduos obesos graves sem DM2 e magros. Foi encontrado aumento no número de células T CD4 acompanhado por seletivo aumento de células T reg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ naturais, e os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF não foram diferentes entre os indivíduos morbidamente obesos e magros. Células T reg. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ naturais, e células Th2 são capazes de polarizar monócitos/macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório que é caracterizado pela produção de mediadores anti-inflamatórios como a IL10 e o TGF β (Van der Weerd et al. 2012). O fenótipo encontrado

principalmente no TAS dos nossos obesos, como aumento de IL10, TGF β e FOXP3, pode ser considerado como um mecanismo regulador da atividade pró-inflamatória no tecido adiposo. A ausência de níveis aumentados de IL6 e TNF tanto no sangue quanto no TA dos OMN nos dá suporte para essa hipótese.

O fatores reguladores avaliados, IL10 e TGF β , correlacionam-se positivamente, principalmente no TAS. Porém, há correlação significativa no TAV entre FOXP3 e IL6 e TNF, evidenciando relação entre esses elementos, caracterizando provavelmente, a regulação também nesse depósito. Evidência semelhante também foi encontrada por análise imunoistoquímica de tecido adiposo epididimal de camundongos obesos C57B6 alimentados com dieta rica em gordura, que indicou a presença de células Treg FOXP3⁺ em estreita proximidade com estruturas semelhantes a coroas formadas por macrófagos (Feuerer et al. 2009). Ainda, esses mesmos autores avaliaram, por RT-PCR, a expressão de RNAm de FOXP3 em tecido adiposo omental e subcutâneo de indivíduos obesos grau III, e encontraram níveis aumentados no tecido subcutâneo, sugerindo que seus achados em camundongos são atribuíveis a humanos, e também corroborando nossos resultados.

Foi demonstrado por Deilulis et al. (2011) que obesos grau III, com alterações metabólicas associadas, têm expressão gênica de FOXP3 diminuída no tecido adiposo omental, em relação a indivíduos magros, além de menos marcadores Th2 e aumento de 30x mais de expressão gênica de IL6, caracterizando perfil pró-inflamatório no TA omental desses indivíduos. Encontramos relação positiva de FOXP3 no TAS e no TAV com os indicadores de obesidade, o que nos permite inferir que a expansão do tecido adiposo seja fator relevante nessa regulação. Tem sido descrito que diferentes subclasses de células T estão presentes no tecido

adiposo, e estão envolvidas no fenótipo dos macrófagos. Macrófagos do tipo M1, classicamente ativados, se acumulam no tecido adiposo de camundongos obesos, e induzem inflamação. Em contraste macrófagos do tipo M2, são polarizados por citocinas do tipo TH2, e regulam positivamente a produção de IL10 e negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Células T reguladoras CD4 têm efeito protetor inibindo macrófagos pró-inflamatórios levando à supressão da resistência á insulina (Ouchi et al. 2011). A expressão aumentada de FOXP3 no TA de obesos do nosso estudo, provavelmente tem influência importante na ausência de DM2 nesses indivíduos, provavelmente por proporcionar um tecido adiposo com perfil mais anti-inflamatório adicionado ao aumento de IL10 e TGF β que são secretadas por macrófagos do tipo M2 e por células T reguladoras (Tiemessen et al. 2007; Bories et al. 2012). A hipótese de que nossos obesos possam estar protegidos do DM2 em decorrência de população aumentada de células Treg FOXP3⁺ no tecido adiposo, pode ser corroborada pelo estudo de (Ilan et al. 2010) que demonstraram acúmulo expressivo de Treg CD4⁺ induzido por TGF β após administração oral de anticorpo anti-CD3 com consequente melhora na inflamação e na sensibilidade á insulina em camundongos obesos com DIO ou ob/ob. O perfil predominantemente anti-inflamatório nos sugere um tecido adiposo subcutâneo saudável nos obesos do nosso estudo coincidindo com ausência de desordens metabólicas. Adicionalmente, a maior frequência de adipócitos menores no TAV dos obesos aponta para característica protetora no desenvolvimento de desordens metabólicas também nesse depósito. (O'Connell et al. 2011) demonstraram que obesos metabolicamente normais possuem adipócito omental menor que obesos com desordens metabólicas, e demonstraram ainda correlação positiva do tamanho do adipócito omental com alterações metabólicas e desenvolvimento de fibrose hepática.

O tecido adiposo subcutâneo e visceral é distinto em função, produção de adipocinas e inflamação. Embora a expansão do tecido adiposo subcutâneo e visceral contribui para a doença metabólica, o tecido subcutâneo é considerado fator de risco mais fraco, e em alguns casos tem efeito protetor (Gealekman et al.2011). O tecido adiposo é provavelmente o tecido mais altamente vascularizado do corpo, e cada adipócito é rodeado por extensa rede capilar. A vasculatura do tecido adiposo promove a distribuição de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento, hormônios e citocinas (Lemoine et al. 2013). Entretanto, a hipertrofia do adipócito cria áreas locais de micro-hipoxia no tecido adiposo nos estágios iniciais de expansão. Isso tem sido verificado em recentes estudos clínicos que sugerem que o tecido adiposo é pobremente oxigenado no estado obeso (Sun et al. 2011). Tem sido sugerido que a hipoxia é o evento inicial da inflamação no tecido adiposo, e provavelmente é resultado da redução do fluxo sanguíneo, hipótese que tem suporte em estudos experimentais e humanos (Ye 2011).

Encontramos nos obesos aumento na expressão de metaloproteinases de matriz 2, 8 e 9 no TAV, em relação ao TAS e em relação ao mesmo depósito nos eutróficos, exceto para a MMP8. As modificações que ocorrem no tecido adiposo durante a obesidade envolvem adipogênese, angiogênese e remodelagem da matriz extracelular. As metaloproteinases de matriz contribuem para cada um desses processos pela degradação da matriz extracelular e de componentes da membrana basal ou pela ativação de fatores de crescimento latentes, processos essenciais para a função adequada do tecido adiposo (Chavey et al. 2003; Van Hul & Lijnen 2008).

A ingestão calórica excessiva mantida por muito tempo favorece a expansão do tecido adiposo, que tem como principais fases a hiperplasia e a hipertrofia do

adipócito. Entretanto a hipertrofia pode fornecer importante proteção contra efeitos lipotóxicos sistêmicos prejudiciais em resposta ao excesso de lipídios. Esses eventos implicam em estresse mecânico por meio do aumento na produção de matriz extracelular, angiogênese limitada e inflamação os quais comprometem a integridade do TA (Sun et al. 2011). Excessiva rigidez da matriz extracelular pode limitar a hipertrofia do adipócito requerida na remodelagem do TA (Lee et al. 2010). A expressão aumentada das MMPs no TAV dos OMN provavelmente vem favorecer a remodelagem, evitando a hipoxia do adipócito hipertrofiado por meio do aumento angiogênese, que também é favorecida pelo TGF β , prevenindo dessa forma a necrose do adipócito e posterior infiltração de macrófagos do tipo M1.

Por outro lado, de acordo com (Lemoine et al. 2013) o tamanho do adipócito pode ser bom indicador da capacidade de adipogênese, pelo menos em indivíduos obesos; assim para uma dada massa gorda, quanto menor o adipócito, mais ativa está a adipogênese. Tem sido sugerido que a inabilidade em ativar a adipogênese pode ser causal no determinismo das desordens metabólicas associadas à hiperalimentação, provavelmente quando a capacidade do tecido adiposo em estocar lipídios é excedida, acarretando deposição ectópica de gordura no fígado e músculos, processo altamente associado à resistência à insulina (Lemoine et al. 2013). Tal fato nos faz sugerir que está havendo influência marcante das MMPs que estão elevadas no TAV de obesos, onde foi encontrado predominância de adipócitos menores em relação ao TAS. Isso pode ser indicativo de maior adipogênese no TAV, como mecanismo de proteção à deposição ectópica de gordura, protegendo os obesos de disfunção metabólica. Importante observar também que houve forte correlação positiva entre MMP2 e TGF β tanto no TAS quanto no TAV, apontando o caráter regulatório dessa MMP. MMP2 e 9 (Gelatinase a e b respectivamente) são

funcionalmente relacionadas e têm papel importante na angiogênese e na ativação do TGF β que por sua vez está envolvido na homeostase da matriz extracelular no tecido adiposo (Bouloumie et al. 2001; Bourlier et al. 2012).

A MMP8 (Colagenase 2) tem sido encontrada em mulheres obesas, porém sem associação com comorbidades. Foi demonstrada elevação nos níveis séricos de MMP8 e redução de MMP9 em obesas metabolicamente normais em relação a indivíduos magros (Andrade et al. 2012). Pouco se sabe sobre a influência da MMP8 na obesidade. Minematsu et al. (2012) demonstraram aumento na expressão de MMP8 em culturas de adipócitos com meio rico em glicose e insulina. Entretanto, já foi demonstrado o efeito anti-inflamatório em modelo experimental de artrite, e também o papel em limitar inflamação aguda em doença pulmonar por inativar a MIP1 (macrophage inflammatory protein 1), evidenciando seu efeito anti-inflamatório (Cox et al. 2012; Minematsu et al. 2012). Nós sugerimos um efeito antinflamatório das MMPs avaliadas no nosso estudo, devido a expressão aumentada nos obesos, que possuem perfil anti-inflamatório no tecido adiposo. O fato de o TAS dos OMN não ter expressão aumentada de MMPs, pode ter relação com o diferente perfil dos depósitos.

No TAS encontramos expressão maior FOXP3⁺ que pode estar indicando presença aumentada de células Treg impedindo a inflamação. No TAV talvez a modulação da matriz esteja desenvolvendo papel mais relevante nessa regulação.

8- CONCLUSÃO

Os indivíduos obesos metabolicamente normais apresentam ausência de perfil inflamatório do tecido adiposo, semelhante aos indivíduos eutróficos, que se deve à maior produção de fatores anti-inflamatórios como IL10 e TGFB e células Treg FOXP3⁺, principalmente no tecido adiposo subcutâneo. É possível que esse perfil esteja exercendo proteção contra o desenvolvimento de desordens metabólicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima, R. S. (2011). "Digging deeper into obesity." J Clin Invest **121**(6): 2076-9.
- Alkhoury, N., A. Gornicka, et al. (2010). "Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis." J Biol Chem **285**(5): 3428-38.
- Andrade, V. L., E. Petruceli, et al. (2012). "Evaluation of plasmatic MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and MPO levels in obese and lean women." Clin Biochem **45**(6): 412-5.
- Balistreri, C. R., C. Caruso, et al. (2010). "The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases." Mediators Inflamm **2010**: 802078.
- Bertola, A., T. Ciucci, et al. (2012). "Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients." Diabetes **61**(9): 2238-47.
- Bigornia, S. J., M. G. Farb, et al. (2012). "Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity." Nutr Diabetes **2**: e30.
- Bluher, M. (2010). "The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals." Curr Opin Lipidol **21**(1): 38-43.
- Bories, G., R. Caiazzo, et al. (2012). "Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects." Diab Vasc Dis Res **9**(3): 189-95.
- Bouloumie, A., C. Sengenès, et al. (2001). "Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation." Diabetes **50**(9): 2080-6.
- Bourlier, V. and A. Bouloumie (2009). "Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance." Diabetes Metab **35**(4): 251-60.
- Bourlier, V., C. Sengenès, et al. (2012). "TGFβ family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages." PLoS One **7**(2): e31274.

- Bray, G. A., M. B. Clearfield, et al. (2009). "Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk." Clin Cornerstone **9**(4): 30-40; discussion 41-2.
- Chang, Y., S. Ryu, et al. (2011). "Impact of BMI on the incidence of metabolic abnormalities in metabolically healthy men." Int J Obes (Lond) **36**(9): 1187-94.
- Chavey, C., B. Mari, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation." J Biol Chem **278**(14): 11888-96.
- Chen, W. and J. E. Konkel (2010). "TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells." J Mol Cell Biol **2**(1): 30-6.
- Chen, X. and J. J. Oppenheim (2011). "Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells." Int Immunopharmacol **11**(10): 1489-96.
- Chen, X., Y. Wu, et al. (2013). "Fat-resident Tregs: an emerging guard protecting from obesity-associated metabolic disorders." Obes Rev.
- Christiaens, V. and H. R. Lijnen (2006). "Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in development of adipose tissue." Arch Physiol Biochem **112**(4-5): 254-9.
- Christiaens, V., I. Scroyen, et al. (2008). "Role of proteolysis in development of murine adipose tissue." Thromb Haemost **99**(2): 290-4.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-55.
- Cipolletta, D., M. Feuerer, et al. (2012). "PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells." Nature **486**(7404): 549-53.
- Cipolletta, D., D. Kolodin, et al. (2011). "Tissular T(regs): a unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism." Semin Immunol **23**(6): 431-7.

- Coelho, M., T. Oliveira, et al. (2013). "Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ." Arch Med Sci **9**(2): 191-200.
- Cox, J. H., A. E. Starr, et al. (2012). "Matrix metalloproteinase 8 deficiency in mice exacerbates inflammatory arthritis through delayed neutrophil apoptosis and reduced caspase 11 expression." Arthritis Rheum **62**(12): 3645-55.
- Cristancho, A. G. and M. A. Lazar (2011). "Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(11): 722-34.
- de Heredia, F. P., S. Gomez-Martinez, et al. (2012). "Obesity, inflammation and the immune system." Proc Nutr Soc **71**(2): 332-8.
- De Lorenzo, A., V. Del Gobbo, et al. (2007). "Normal-weight obese syndrome: early inflammation?" Am J Clin Nutr **85**(1): 40-5.
- Deiuliis, J., Z. Shah, et al. (2011). "Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers." PLoS One **6**(1): e16376.
- DeMarco, V. G., M. S. Johnson, et al. (2010). "Cytokine abnormalities in the etiology of the cardiometabolic syndrome." Curr Hypertens Rep **12**(2): 93-8.
- Despres, J. P., I. Lemieux, et al. (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(6): 1039-49.
- Durward, C. M., T. J. Hartman, et al. (2012). "All-cause mortality risk of metabolically healthy obese individuals in NHANES III." J Obes **2012**: 460321.
- Eller, K., A. Kirsch, et al. (2011). "Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy." Diabetes **60**(11): 2954-62.
- Esposito, K., A. Pontillo, et al. (2003). "Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 1055-8.

- Fain, J. N. (2010). "Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review." Mediators Inflamm **2010**: 513948.
- Fain, J. N., D. S. Tichansky, et al. (2005). "Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity." Metabolism **54**(11): 1546-51.
- Feuerer, M., L. Herrero, et al. (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." Nat Med **15**(8): 930-9.
- Fink, L. N., A. Oberbach, et al. (2013). "Expression of anti-inflammatory macrophage genes within skeletal muscle correlates with insulin sensitivity in human obesity and type 2 diabetes." Diabetologia.
- Fujisaka, S., I. Usui, et al. (2009). "Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice." Diabetes **58**(11): 2574-82.
- Galic, S., J. S. Oakhill, et al. (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 129-39.
- Girard, J. and M. Lafontan (2008). "Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism." Diabetes Metab **34**(5): 439-45.
- Gotoh, K., M. Inoue, et al. (2012). "A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver." Diabetes **61**(8): 1994-2003.
- Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition." Circulation **109**(3): 433-8.
- Gualillo, O., J. R. Gonzalez-Juanatey, et al. (2007). "The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives." Trends Cardiovasc Med **17**(8): 275-83.

- Guilherme, A., J. V. Virbasius, et al. (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 367-77.
- Hardy, O. T., R. A. Perugini, et al. (2011). "Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity." Surg Obes Relat Dis **7**(1): 60-7.
- Harford, K. A., C. M. Reynolds, et al. (2011). "Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue." Proc Nutr Soc **70**(4): 408-17.
- Hermisdorff, H. H., M. Angeles Zulet, et al. (2008). "Effect of diet on the low-grade and chronic inflammation associated with obesity and metabolic syndrome." Endocrinol Nutr **55**(9): 409-419.
- Hoene, M. and C. Weigert (2008). "The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance." Obes Rev **9**(1): 20-9.
- Hong, E. G., H. J. Ko, et al. (2009). "Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle." Diabetes **58**(11): 2525-35.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Ilan, Y., R. Maron, et al. (2010). "Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(21): 9765-70.
- Itoh, M., T. Suganami, et al. (2011). "Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation." Int J Inflam **2011**: 720926.
- Jung, C. H. and M. S. Kim (2013). "Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity." Arch Pharm Res **36**(2): 201-7.
- Kalupahana, N. S., N. Moustaid-Moussa, et al. (2012). "Immunity as a link between obesity and insulin resistance." Mol Aspects Med **33**(1): 26-34.

- Kaminski, D. A. and T. D. Randall (2010). "Adaptive immunity and adipose tissue biology." Trends Immunol **31**(10): 384-90.
- Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." J Clin Invest **116**(6): 1494-505.
- Karelis, A. D., M. Brochu, et al. (2004). "Clinical markers for the identification of metabolically healthy but obese individuals." Diabetes Obes Metab **6**(6): 456-7.
- Karelis, A. D., M. Faraj, et al. (2005). "The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4145-50.
- Lago, F., R. Gomez, et al. (2009). "Adipokines as novel modulators of lipid metabolism." Trends Biochem Sci **34**(10): 500-10.
- Leal Vde, O. and D. Mafra (2013). "Adipokines in obesity." Clin Chim Acta **419**: 87-94.
- Lee, J. (2013). "Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes." Arch Pharm Res **36**(2): 208-22.
- Lee, M. J., Y. Wu, et al. (2010). "Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 371-6.
- Lemoine, A. Y., S. Ledoux, et al. (2013). "Adipose tissue angiogenesis in obesity." Thromb Haemost **110**(1).
- Lenz, A. and F. B. Diamond, Jr. (2008). "Obesity: the hormonal milieu." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **15**(1): 9-20.
- Li, Z. Y., P. Wang, et al. (2011). "Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease." Clin Exp Pharmacol Physiol **38**(12): 888-96.
- Lolmede, K., C. Duffaut, et al. (2011). "Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders." Diabetes Metab **37**(4): 283-90.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Madec, S., M. Chiarugi, et al. (2010). "Pattern of expression of inflammatory markers in adipose tissue of untreated hypertensive patients." J Hypertens **28**(7): 1459-65.
- Marini, M. A., E. Succurro, et al. (2007). "Metabolically healthy but obese women have an intermediate cardiovascular risk profile between healthy nonobese women and obese insulin-resistant women." Diabetes Care **30**(8): 2145-7.
- Marinou, K., D. Tousoulis, et al. (2010). "Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification." Int J Cardiol **138**(1): 3-8.
- Maruyama, T., J. E. Konkel, et al. (2011). "The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation." Semin Immunol **23**(6): 418-23.
- Maury, E. and S. M. Brichard (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome." Mol Cell Endocrinol **314**(1): 1-16.
- Maynard, C. L., R. D. Hatton, et al. (2009). "Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells." J Exp Med **206**(2): 343-57.
- Messier, V., A. D. Karelis, et al. (2010). "Metabolically healthy but obese individuals: relationship with hepatic enzymes." Metabolism **59**(1): 20-4.
- Minematsu, T., L. Huang, et al. (2012). "Altered expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in matured rat adipocytes in vitro." Biol Res Nurs **14**(3): 242-9.
- Morrison, C. D., P. Huypens, et al. (2009). "Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity." Biochim Biophys Acta **1792**(5): 409-16.
- O'Connell, J., L. Lynch, et al. (2011). "The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity." PLoS One **5**(4): e9997.

- Oh, J., H. Lee, et al. (2012). "Ginseng and Its Active Components Ginsenosides Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells by Regulating MMP-2 and MMP-9." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 265023.
- Oswal, A. and G. Yeo (2010). "Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity." Obesity (Silver Spring) **18**(2): 221-9.
- Ouchi, N., J. L. Parker, et al. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 85-97.
- Pataky, Z., E. Bobbioni-Harsch, et al. (2010). "Open questions about metabolically normal obesity." Int J Obes (Lond) **34 Suppl 2**: S18-23.
- Pataky, Z., V. Makoundou, et al. (2011). "Metabolic normality in overweight and obese subjects. Which parameters? Which risks?" Int J Obes (Lond) **35**(9): 1208-15.
- Patel, P. S., E. D. Buras, et al. (2013). "The role of the immune system in obesity and insulin resistance." J Obes **2013**: 616193.
- Pisprasert, V., K. H. Ingram, et al. (2013). "Limitations in the use of indices using glucose and insulin levels to predict insulin sensitivity: impact of race and gender and superiority of the indices derived from oral glucose tolerance test in African Americans." Diabetes Care **36**(4): 845-53.
- Primeau, V., L. Coderre, et al. (2011). "Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy." Int J Obes (Lond) **35**(7): 971-81.
- Pujanek, M., A. Bronisz, et al. (2013). "Pathomechanisms of the development of obesity in some endocrinopathies - an overview." Endokrynol Pol **64**(2): 150-5.
- Sell, H. and J. Eckel (2010). "Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 366-70.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-80.

- Simpson, F. and J. P. Whitehead (2010). "Adiponectin--it's all about the modifications." Int J Biochem Cell Biol **42**(6): 785-8.
- Singh, M., U. S. Bedi, et al. (2010). "Leptin and the clinical cardiovascular risk." Int J Cardiol **140**(3): 266-71.
- Suganami, T. and Y. Ogawa (2010). "Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling." J Leukoc Biol **88**(1): 33-9.
- Suganami, T., M. Tanaka, et al. (2012). "Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation." Endocr J **59**(10): 849-57.
- Sun, K., C. M. Kusminski, et al. (2011). "Adipose tissue remodeling and obesity." J Clin Invest **121**(6): 2094-101.
- Tan, C. K., H. C. Chong, et al. (2012). "Getting 'Smad' about obesity and diabetes." Nutr Diabetes **2**: e29.
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19446-51.
- Trayhurn, P. (2007). "Adipocyte biology." Obes Rev **8 Suppl 1**: 41-4.
- Tzanetakou, I. P., N. L. Katsilambros, et al. (2012). "'Is obesity linked to aging?': adipose tissue and the role of telomeres." Ageing Res Rev **11**(2): 220-9.
- van der Weerd, K., W. A. Dik, et al. (2012). "Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype." Diabetes **61**(2): 401-8.
- Van Hul, M. and H. R. Lijnen (2008). "A functional role of gelatinase A in the development of nutritionally induced obesity in mice." J Thromb Haemost **6**(7): 1198-206.
- Vazquez-Vela, M. E., N. Torres, et al. (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." Arch Med Res **39**(8): 715-28.

- Villaret, A., J. Galitzky, et al. (2010). "Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence." Diabetes **59**(11): 2755-63.
- Weiss, A. and L. Attisano (2013). "The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol **2**(1): 47-63.
- Wildman, R. P., P. Muntner, et al. (2008). "The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004)." Arch Intern Med **168**(15): 1617-24.
- Xu, X. J., W. J. Pories, et al. (2013). "What distinguishes adipose tissue of severely obese humans who are insulin sensitive and resistant?" Curr Opin Lipidol **24**(1): 49-56.
- Yadav, A., M. A. Kataria, et al. (2012). "Role of leptin and adiponectin in insulin resistance." Clin Chim Acta.
- Yadav, H., C. Quijano, et al. (2011). "Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling." Cell Metab **14**(1): 67-79.
- Yamauchi, T. and T. Kadowaki (2008). "Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases." Int J Obes (Lond) **32 Suppl 7**: S13-8.
- Ye, J. (2011). "Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation." Curr Diab Rep **11**(3): 203-10.
- Ye, J. (2013). "Mechanisms of insulin resistance in obesity." Front Med **7**(1): 14-24.
- Ye, J. and O. P. McGuinness (2013). "Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies." Am J Physiol Endocrinol Metab **304**(5): E466-77.
- Zamani, N. and C. W. Brown (2011). "Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure." Endocr Rev **32**(3): 387-403.

Zou, C. and J. Shao (2008). "Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance." J Nutr Biochem **19**(5): 277-86.

Zuo, H., Z. Shi, et al. (2013). "Association between serum leptin concentrations and insulin resistance: a population-based study from China." PLoS One **8**(1): e54615.