

**Viviane Zorzanelli Rocha Giraldez**

**Avaliação do papel da imunidade adaptativa na obesidade:  
estudo experimental em animais**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho

São Paulo

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Giraldez, Viviane Zorzanelli Rocha

Avaliação do papel da imunidade adaptativa na obesidade: estudo experimental em animais / Viviane Zorzanelli Rocha Giraldez. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: Raul Dias dos Santos Filho.

Descritores: 1.Obesidade 2.Tecido adiposo 3.Inflamação 4.Linfócitos T  
5.Células Th1 6.Interferon gama 7.Macrófagos 8.Receptores CXCR3  
9.Glucose/metabolismo 10.Experimentação animal

USP/FM/DBD-006/14

*“It is not his possession of knowledge, of irrefutable truth, that makes the man of science, but his persistent and recklessly critical quest for truth.”*

*Karl Raimund Popper  
In *The Logic of Scientific Discovery* (1959, 1972), 81.*

**Dedicatória**

---

*A Deus, por ter-me iluminado em todos os meus passos, dedico minha eterna devoção e gratidão.*

*Aos meus amados pais, Zulmira Zorzanelli Rocha e Sylvio Souza Rocha, por terem me educado segundo os valores da humildade e honestidade; e pelo apoio absolutamente incondicional em todas as etapas da minha vida, o que me possibilitou vencer muitos desafios e concretizar grandes sonhos. O meu amor eterno e minha profunda gratidão por toda a abdição e dedicação às suas duas filhas.*

*Ao meu marido, Roberto Rocha C. V. Giraldez, pelo apoio incansável em importantes etapas da minha vida, e pelo seu carinho e companheirismo em todos os momentos, difíceis ou felizes, dedico meu amor eterno.*

*Ao meu filho, Henrique Zorzanelli R. Giraldez, que com sua doçura e sincera inocência, já me ensinou a sentir um amor imensurável, um amor que fere de tão intenso, mas ao mesmo tempo cura a alma, um amor infinito.*

*A minha querida irmã, Giovana Zorzanelli Rocha  
Melim, que com sua energia contagiante, sempre me  
ajudou a encarar obstáculos de uma forma mais simples, e a  
vida de uma forma mais alegre e descomplicada.*

*Ao meu amado sobrinho, Rodrigo Zorzanelli Rocha  
Melim, que com seu sorriso, enche minha alma de alegria e  
paz.*

*Ao meu cunhado Rodrigo Melim, por seu amor  
admirável e dedicação incansável à família.*

## **Agradecimentos**

---

*To my supervisor, master, and friend Dr. Peter Libby, for the immense support during my Harvard years and afterwards. For being a role model of dedication, efficiency and leadership, I dedicate to you my eternal admiration and gratitude.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho, pelo exemplo diário em sua incessante busca pelo conhecimento, paixão e dedicação à ciência, e por todo o suporte recebido desde o meu retorno ao InCor, minha grande admiração, profunda gratidão e eterna amizade.*



*Ao Prof. Dr. José Antônio Franchini Ramires, pelo seu carinho e enorme suporte, que me permitiram os primeiros e importantes passos rumo ao aperfeiçoamento científico no exterior.*

*Ao Prof. Dr. Roberto Kalil Filho, por sua amizade e grande apoio que me ajudaram enormemente a iniciar minha trajetória nos Estados Unidos.*

*A minha colega e amiga, Dra. Ana Paula Marte Chacra, por sua admirável busca pelo bem estar dos pacientes e do próximo, sua capacidade de se mobilizar diante da dor alheia e de se emocionar com as injustiças, e pelo apoio ilimitado, minha profunda admiração, gratidão e amizade.*

*Ao meu colega e amigo, Dr. Wilson Salgado Filho, pelo seu profundo otimismo e serenidade que o tornam presença sempre amistosa e querida em nosso meio, e pelo suporte jamais negado, minha enorme gratidão e amizade.*

*A Sueli Stifoni, minha profunda gratidão pelo seu grande apoio, carinho e paciência diários.*

*Ao colega e amigo Marcio Miname, por todas as frutíferas discussões médicas e científicas, pelo apoio dentro da unidade e pela amizade.*

*À querida amiga Ana Carolina Moron Miguel, pela agradável convivência no exterior, e pelo apoio e grande carinho desde o meu retorno ao Brasil, dedico minha eterna amizade.*

*A Carolina Pereira, pela forte amizade cultivada durante o doutoramento, que me deu grande apoio para seguir em frente.*

*Aos meus colegas e queridos amigos, Antonio Gabrielle Laurinavicius, Leonardo Mangili e Otavio Mangili, Henrique Lane Staniak, Paulo Harada e Leonardo Mateus Lima, que tornaram a minha rotina na unidade de Lípides um contínuo aprendizado em um ambiente sempre acolhedor e caloroso.*

*Ao Prof. Dr. Raul Maranhão, pelo incentivo constante e pela amizade que tanto me ajudaram desde o meu retorno ao Brasil.*

*Aos funcionários da pós-graduação, principalmente Neusa e Juliana, que sempre me ajudaram com presteza, e ao mesmo tempo, carinho e compreensão.*

*To my supervisor, and most important of all, dearest friend, Eduardo J. Folco, who stood beside me from the moment I arrived in Boston to the moment I left, giving me unconditional support in science and life in United States, my endless gratitude.*

*To all my dear friends with whom I had the privilege to share some of the greatest experiences of my life: René Packard, Yuri Sheikine, Thomas Christen, Eva Tang, Gabriela Orasanu, Jorge Plutzky, Israel Gotsman, Vinay Nadimpally, Jesus San-Roman, Fabrice Schneider, Stephanie Schulte, Chunyu Zheng, Joey Shepherd, Lindsey MacFarlane, Andreas Zirlik, Norbert Gerdes, Kevin Croce, Pilar Alcaide, Ángeles Álvarez Ribelles, among many others.*

*To Elissa Simon-Morrissey, Mark MacMillan, David Lynn, Galina Sukhova, Eugenia Shvartz, Yevgenia Tesmenitsky, for their unlimited support, and most importantly, their unforgettable friendship.*

**Normatização adotada**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## **Sumário**

---

	Pág.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sobre peso e Obesidade – Definições.....	4
1.2 Fisiopatologia da Obesidade – Bases Inflamatórias.....	5
1.2.1 A obesidade como doença inflamatória e o tecido adiposo como órgão endócrino.....	5
1.2.2 Possíveis elos fisiopatológicos entre inflamação e resistência insulínica.....	11
1.2.3 Analogia entre aspectos inflamatórios da aterosclerose e da obesidade.....	12
1.2.4 Possíveis mecanismos de acúmulo das células inflamatórias no tecido adiposo na obesidade.....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Animais.....	22
3.2 Análise por citometria de fluxo de células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo.....	24
3.3 Análise por imunohistoquímica de células inflamatórias derivadas de tecido adiposo.....	25
3.4 Citometria de fluxo com coloração intracelular de células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo.....	26
3.5 Cultura e diferenciação de células 3T3-L1.....	27
3.6 Cultura Organóide.....	28
3.7 Efeitos das Células T sobre Adipócitos Maduros.....	28
3.8 Determinações Metabólicas e Dosagem de Citocinas.....	29
3.9 Análise de Perfil de Transcrição ( <i>Microarray</i> ).....	30
3.10 Quantificação da Expressão Gênica através de PCR Quantitativo.....	30
3.11 Calorimetria Indireta, Atividade Física, e Ingesta Alimentar.....	32
3.12 Análise estatística.....	33
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Células T são mais numerosas em tecido adiposo de camundongos obesos do que em tecido adiposo de seus	35

---

	respectivos controles.....	
4.2	A expressão de IFN- $\gamma$ no tecido adiposo aumenta em camundongos obesos.....	38
4.3	IFN- $\gamma$ estimula a expressão de quimiocinas por células 3T3-L1 <i>in vitro</i> .....	40
4.4	A deficiência de IFN- $\gamma$ em camundongos limita a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo e aumenta a tolerância à glicose <i>in vivo</i> .....	44
4.5	A deficiência de IFN- $\gamma$ altera os níveis de leptina e colesterol total.....	49
4.6	A deficiência de IFN- $\gamma$ reduz o acúmulo de células inflamatórias no tecido adiposo.....	51
4.7	A deficiência do receptor de IFN- $\gamma$ regula a inflamação no tecido adiposo visceral e afeta os metabolismos lipídico e glicêmico em camundongos obesos ApoE <sup>-/-</sup> .....	53
4.8	Camundongos C57BL/6 obesos exibem maior expressão de CXCR3 no tecido adiposo visceral do que os não-obesos.....	57
4.9	Camundongos obesos deficientes em CXCR3 acumulam menos células T em seu tecido adiposo visceral do que controles obesos.....	59
4.10	Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem expressão reduzida de genes inflamatórios em seu tecido adiposo em comparação a controles obesos.....	67
4.11	Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem maior tolerância à glicose e níveis plasmáticos de leptina e colesterol total mais baixos em comparação a controles obesos.....	71
5.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
7	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
8	<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>



**Listas**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ApoE:</b>	apolipoproteína E
<b>CCL5:</b>	<i>chemokine (CC-motif) ligand 5</i>
<b>CCR2:</b>	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
<b>CCR5:</b>	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
<b>CXCL10:</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
<b>CXCL11:</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
<b>CXCL9:</b>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
<b>GLUT-4:</b>	transportador de glicose tipo 4
<b>I-TAC:</b>	quimiocina alfa de célula T induzida por interferon
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	interferon-gama
<b>IKK:</b>	quinase I $\kappa$ B
<b>IL-10:</b>	interleucina-10
<b>IL-13:</b>	interleucina-13
<b>IL-4:</b>	interleucina-4
<b>IL-6:</b>	interleucina-6
<b>IP-10:</b>	proteína induzida por interferon-gama
<b>IRS:</b>	substrato do receptor de insulina
<b>JNK:</b>	quinase c-Jun N-terminal
<b>MAPK:</b>	proteína quinase mitógeno-ativada
<b>MCP-1:</b>	proteína quimiotática de monócito
<b>MHC II:</b>	complexo principal de histocompatibilidade classe II
<b>MIG:</b>	monocina induzida por interferon-gama
<b>mRNA:</b>	RNA mensageiro
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	fator nuclear kappa B
<b>RANTES:</b>	regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
<b>TCR:</b>	receptor de célula T

<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	fator de transformação do crescimento-beta
<b>Th1:</b>	<i>T-helper 1</i>
<b>Th2:</b>	<i>T-helper 2</i>
<b>TLRs:</b>	receptores Toll-like
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>ACK:</b>	<i>ammonium-chloride-potassium</i>
<b>PBS:</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>PMA:</b>	forbol 12-miristato 13-acetato
<b>GAPDH:</b>	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>Vs:</b>	versus
<b>Células NK:</b>	células <i>natural killer</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%:</b>	porcento
<b>&lt;;</b>	menor que
<b>=;</b>	igual
<b>&gt;;</b>	maior que
<b>g;</b>	grama
<b>h:</b>	hora
<b>kcal:</b>	quilocalorias
<b>Kg:</b>	quilograma
<b>m2:</b>	metro quadrado
<b>mg:</b>	miligrama
<b>ml:</b>	mililitro
<b>U:</b>	unidades
<b>µm:</b>	micrômetro
<b>µg/ml:</b>	micrograma por mililitro
<b>ng/ml:</b>	nanograma por mililitro

	Pag.
<b>Tabela 1.</b> Adipocitocinas.....	8
<b>Tabela 2.</b> Modelos de camundongos utilizados.....	23

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Tecido adiposo visceral de camundongos obesos apresenta maior número de células inflamatórias do que o tecido adiposo de controles não-obesos.....	37
<b>Figura 2.</b> A expressão de IFN- $\gamma$ no tecido adiposo aumenta em camundongos sujeitos a obesidade induzida por dieta.....	39
<b>Figura 3.</b> O IFN $\gamma$ estimula a expressão de quimiocinas em células 3T3-L1.....	42
<b>Figura 4.</b> IFN $\gamma$ induz a expressão de citocinas pelo tecido adiposo em cultura.....	44
<b>Figura 5.</b> A deficiência de IFN- $\gamma$ não altera o peso corporal, mas melhora a tolerância à glicose em camundongos obesos.....	46
<b>Figura 6.</b> IFN- $\gamma$ regula a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo de camundongos obesos.....	48
<b>Figura 7.</b> Níveis plasmáticos de adiponectina, leptina, e colesterol total.....	50
<b>Figura 8.</b> A deficiência de IFN $\gamma$ limita o acúmulo de células inflamatórias em tecido adiposo visceral.....	52
<b>Figura 9.</b> A deficiência do receptor de IFN $\gamma$ regula a inflamação no tecido adiposo visceral de camundongos obesos ApoE <sup>-/-</sup> ..	55
<b>Figura 10.</b> Níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides e glicose em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> e IFN $\gamma$ R <sup>-/-</sup> ApoE <sup>-/-</sup> .....	56
<b>Figura 11.</b> Células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo visceral de camundongos obesos apresentam maior expressão de CXCR3 do que células de camundongos não-obesos.....	58
<b>Figura 12.</b> Camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles apresentaram peso corporal similar após 8 e 16 semanas de dieta rica em gorduras (HFD).....	60
<b>Figura 13.</b> O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 apresenta menos células T do que controles obesos após 8 semanas de dieta rica em gordura, por citometria de fluxo.....	62
<b>Figura 14.</b> O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 apresentou menos células T do que controles obesos, por imunohistoquímica.....	63
<b>Figura 15.</b> Os baços de camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles apresentaram proporções similares de macrófagos e linfócitos.....	64

<b>Figura 16.</b>	O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibiu menos células T do que controles obesos após 16 semanas de dieta rica em gordura, por citometria de fluxo.....	66
<b>Figura 17.</b>	Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem expressão reduzida de genes relacionados a inflamação em seu tecido adiposo visceral, em comparação a controles obesos.....	68
<b>Figura 18.</b>	O tecido adiposo visceral de camundongos deficientes em CXCR3 apresentou menos células Foxp3-positivas do que o tecido adiposo de seus controles, por imunohistoquímica.....	70
<b>Figura 19.</b>	Camundongos deficientes em CXCR3 apresentam maior tolerância à glicose do que seus respectivos controles.....	72
<b>Figura 20.</b>	Camundongos obesos com deficiência de CXCR3 exibem níveis plasmáticos reduzidos de leptina e colesterol total, comparados com controles obesos.....	73
<b>Figura 21.</b>	A imunidade adaptativa na rede inflamatória do tecido adiposo na obesidade.....	89

**Resumo**

---



Rocha VZ. Avaliação do Papel da Imunidade Adaptativa na Obesidade – Estudo Experimental em Animais. (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O desenvolvimento gradual e recente de uma epidemia mundial de obesidade alavancou sobremaneira o estudo dessa condição e de suas comorbidades metabólicas. No âmbito fisiopatológico, múltiplos estudos demonstraram a expressão aumentada de mediadores inflamatórios no tecido adiposo de animais e humanos obesos, o acúmulo local de macrófagos, e um papel central da inflamação no desequilíbrio da homeostase metabólica local e sistêmica na obesidade. A definição de um papel ativo dos macrófagos, e portanto da imunidade inata, na rede inflamatória do tecido adiposo, evocou a hipótese de que, similarmente a outras condições inflamatórias crônicas como a aterosclerose, a obesidade também contaria com a importante participação de elementos da imunidade adaptativa, como as células T e suas citocinas, em sua fisiopatologia. Com base nessas considerações, os objetivos principais desse estudo foram: 1) avaliar a presença das células T e o papel do interferon-gama (IFN $\gamma$ ), clássica citocina T-helper 1 (ou Th1), na inflamação do tecido adiposo; e 2) estudar mecanismos de acúmulo das células T no tecido adiposo na obesidade, particularmente a participação do receptor CXCR3 nesse processo. Experimentos de citometria de fluxo mostraram que o tecido adiposo visceral de camundongos C57BL/6 obesos após consumo de dieta rica em gorduras apresentou maior número de macrófagos e também de células T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em comparação a controles que receberam dieta pobre em gorduras. A expressão de I-A<sup>b</sup>, marcador do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II) murino, também foi maior no tecido adiposo dos animais obesos, sugerindo a presença local da atividade de apresentação de antígeno e ativação das células T. Quando estimuladas *in vitro*, células T derivadas do tecido adiposo de camundongos obesos produziram mais IFN $\gamma$  do que aquelas isoladas de controles, novamente sugerindo a ativação dessas células em um contexto de obesidade. Na análise das possíveis funções do IFN $\gamma$  no tecido adiposo, a estimulação da linhagem de células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos com IFN $\gamma$  recombinante resultou na produção aumentada de quimiocinas de macrófagos, como a proteína quimiotática de monócito (MCP-1), e de quimiocinas de células T, como a proteína 10 induzida por IFN $\gamma$  (IP-10) e monocina induzida por IFN $\gamma$  (MIG). A estimulação de adipócitos com o sobrenadante de células Th1 cultivadas *in vitro*, com

abundante concentração de IFN $\gamma$ , também levou à produção aumentada de IP-10. Em análise mais ampla, através de *microarray*, dos possíveis efeitos do IFN $\gamma$  na expressão gênica de adipócitos, o tratamento dessas células com 100 U/ml de IFN $\gamma$  resultou na expressão aumentada de diversas quimiocinas e seus receptores em comparação ao grupo tratado com placebo. Similarmente à estimulação de células isoladas com IFN $\gamma$ , a incubação de tecido adiposo *ex vivo* de camundongos com essa citocina também resultou em secreção aumentada de IP-10, MIG e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). A investigação do papel do IFN $\gamma$  na inflamação do tecido adiposo *in vivo* envolveu camundongos com deficiência de IFN $\gamma$  e controles, ambos os grupos submetidos a dieta rica em gorduras (obesos) ou pobre em gorduras (não-obesos). Camundongos obesos deficientes em IFN $\gamma$  apresentaram expressão reduzida de mRNA de genes inflamatórios como TNF- $\alpha$  e MCP-1 no tecido adiposo; acúmulo local reduzido de macrófagos; e maior tolerância à glicose em comparação aos controles sob mesma dieta. Animais com deficiência de apolipoproteína E (ApoE) e também do receptor de IFN $\gamma$  também apresentaram em seu tecido adiposo a expressão reduzida de mRNA de genes inflamatórios, particularmente relacionados às células T, como IP-10, MIG, e o receptor CXCR3, em comparação aos controles com deficiência única de ApoE. Resultados *in vitro* e *in vivo* sugerem conjuntamente um importante papel do IFN $\gamma$ , e portanto, das células T e da imunidade adaptativa, na rede inflamatória do tecido adiposo na obesidade, com conseqüente impacto metabólico sistêmico. A presença de células T ativadas no tecido adiposo e seu acúmulo diferencial na obesidade motivaram também a pesquisa de potenciais mecanismos quimiotáticos reguladores desse processo. CXCR3, receptor das quimiocinas de células T, IP-10, MIG e quimiocina alfa de células T IFN $\gamma$ -induzida (I-TAC), é expresso preferencialmente em células T ativadas, e detém papel central na migração dessas células em outras condições inflamatórias crônicas, como a aterosclerose. Em camundongos com deficiência de CXCR3 e que receberam dieta rica em gorduras por 8 ou 16 semanas, o tecido adiposo apresentou significativamente menos células T, incluindo as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em comparação a controles submetidos a mesma dieta. Os números similares de células T e outras populações de leucócitos no baço e sangue periférico dos animais deficientes em CXCR3 e controles fortalecem o conceito de um efeito do CXCR3 sobre o acúmulo de células T no tecido adiposo, independentemente do número de células circulantes e periféricas. Os camundongos deficientes em CXCR3 apresentaram também maior tolerância à glicose e expressão reduzida de mRNA de mediadores inflamatórios em seu

tecido adiposo em comparação aos controles após 8 semanas de dieta rica em gorduras. No entanto, a diferença na tolerância à glicose entre os dois grupos tornou-se não significativa após 16 semanas de dieta gordurosa, coincidindo com redução substancial na expressão de mRNA de mediadores anti-inflamatórios (como interleucina-10 [IL-10] e Arginase 1), e número reduzido de células T regulatórias no tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 em relação a controles. Esses resultados sugerem que o CXCR3 é capaz de regular o acúmulo de células T de diferentes subtipos, com perfil pró-inflamatório ou anti-inflamatório. Em conclusão, nossos resultados revelam um importante papel da citocina Th1 IFN $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo na obesidade em camundongos, sugerindo a participação fundamental das células T e portanto, da imunidade adaptativa nesse cenário. Além disso, o receptor CXCR3 contribui significativamente para o acúmulo das células T, incluindo as células T regulatórias, no tecido adiposo desses animais.

Descritores: Obesidade, tecido adiposo, inflamação, linfócitos T, células Th1, interferon gama, macrófagos, receptores CXCR3, glucose/metabolismo, experimentação animal.

## **Summary**

---

Rocha VZ. Evaluation of the Role of Adaptive Immunity in Obesity – Study in Animals. (thesis). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

The gradual and recent development of a worldwide epidemic of obesity greatly leveraged the study of this condition and its metabolic comorbidities. In the pathophysiologic context, multiple studies have demonstrated increased expression of inflammatory mediators in adipose tissue of obese animals and humans, the local macrophage accumulation, and a central role of inflammation in the imbalance of local or systemic metabolic homeostasis in obesity. The concept of an active role of macrophages and thus of innate immunity in the inflammatory network of adipose tissue, suggested the hypothesis that, similar to other chronic inflammatory conditions such as atherosclerosis, obesity also count on the participation of important elements of adaptive immunity such as T cells and their cytokines in its pathophysiology. Based on these considerations, the main objectives of this study were: 1) to evaluate the presence of T cells and the role of interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), classic T-helper 1 (Th1) cytokine, in adipose tissue inflammation, and 2) to study mechanisms of T cell accumulation in adipose tissue in the context of obesity, particularly the involvement of CXCR3 receptor in this process. Flow cytometry experiments showed that the visceral fat tissue of C57BL/6 obese mice fed a high fat diet showed a greater number of macrophages and also T cells, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, compared to controls fed a low-fat diet. The expression of I-A<sup>b</sup>, murine marker of class II major histocompatibility complex (MHC II), was also higher in adipose tissue of obese animals, suggesting the presence of local antigen presentation and consequent T cell activation. When stimulated *in vitro*, T cells derived from adipose tissue of obese mice produced more IFN $\gamma$  than those isolated from controls, again suggesting the activation of these cells in the context of obesity. In the analysis of possible functions of IFN $\gamma$  in adipose tissue, stimulation of 3T3-L1 cells differentiated into adipocytes with recombinant IFN $\gamma$  resulted in enhanced production of macrophage chemokines, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and T-cell chemokines, such as interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) and monokine induced by gamma interferon (MIG). The stimulation of adipocytes with the supernatant of *in vitro* cultured Th1 cells, with abundant levels of IFN $\gamma$ , has also led to increased IP-10 production. In a broader analysis, by microarray, of the possible effects of IFN $\gamma$  on adipocyte gene expression, treatment of these cells with 100 U/ml of IFN $\gamma$

resulted in increased expression of several CC and CXC chemokines and their receptors in comparison to the placebo group. Similarly to the stimulation of isolated cells with IFN $\gamma$ , incubation of *ex vivo* adipose tissue with this cytokine also resulted in increased IP-10, MIG and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) secretion. The investigation of the role of IFN $\gamma$  in adipose tissue inflammation *in vivo* involved mice with deficiency of IFN $\gamma$  and controls, both groups consuming either a high-fat diet (obese) or a low-fat diet (lean). Obese IFN $\gamma$ -deficient mice showed reduced mRNA expression of inflammatory genes such as TNF $\alpha$  and MCP-1 in adipose tissue, reduced local accumulation of macrophages, and better glucose tolerance compared to animals on the same diet. Mice with ApoE and IFN $\gamma$  receptor double deficiency also showed reduced adipose tissue mRNA expression of inflammatory genes, particularly T cell-related genes, such as IP-10, MIG, and CXCR3, compared to controls with single ApoE deficiency. *In vitro* and *in vivo* results together suggest an important role of IFN $\gamma$ , and therefore implications for T cells and adaptive immunity in the inflammatory network of adipose tissue in obesity. The presence of activated T cells in adipose tissue and its differential accumulation in obesity also motivated the search for potential chemotactic mechanisms that may regulate this process. CXCR3, chemokine receptor for IP-10, MIG and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (I-TAC), is predominantly expressed on activated T cells and has a central role in T cell migration in other chronic inflammatory conditions such as atherosclerosis. CXCR3-deficient mice on high-fat diet for 8 or 16 weeks, had significantly less adipose tissue T cells, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, compared to controls on the same diet. Similar numbers of T cells and other leukocyte populations in the peripheral blood and spleen of CXCR3-deficient mice and controls strengthened the concept of a CXCR3 effect on T cell accumulation in the fat tissue, regardless of the number of circulating and peripheral cells. CXCR3-deficient mice also had better glucose tolerance and reduced mRNA expression of inflammatory mediators in their adipose tissue compared to controls after 8 weeks of high-fat diet. However, the difference in glucose tolerance between the two groups became non-significant after 16 weeks of high-fat diet, coinciding with a substantial reduction in the mRNA expression of anti-inflammatory mediators (such as interleukin-10 [IL-10] and arginase 1) and also a reduced number of regulatory T cells in the adipose tissue of CXCR3-deficient mice compared to controls. These results suggest that CXCR3 is able to regulate the accumulation of various subtypes of T cells, with either proinflammatory or anti-inflammatory profile. In conclusion, our results reveal an important role of the Th1 cytokine IFN $\gamma$  in the inflammatory

network of adipose tissue in obesity in mice, suggesting a key role of T cells and therefore of adaptive immunity in this scenario. The CXCR3 receptor contributes significantly to the accumulation of T cells, including regulatory T cells in the adipose tissue of these animals.

Descriptors: Obesity, adipose tissue, inflammation, T lymphocytes, Th1 cells, interferon gamma, macrophages, CXCR3 receptors, glucose/metabolism, animal experimentation.

# **1 Introdução**

---



O recente desenvolvimento de uma pandemia mundial de obesidade tem sido alvo de grande preocupação e interesse da comunidade científica. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos eram portadores de sobrepeso e mais de 500 milhões eram obesos. A prevalência de obesidade praticamente dobrou entre 1980 e 2008. Em 2010, o número de crianças com idade inferior a 5 anos e portadoras de sobrepeso no mundo foi estimado em mais de 40 milhões, sendo aproximadamente 35 milhões residentes em países em desenvolvimento. A prevalência da obesidade infantil vem se expandindo em velocidade alarmante, tornando esse problema um dos maiores e mais sérios desafios em saúde pública do século atual<sup>(1-3)</sup>.

As estatísticas atuais acerca do sobrepeso e da obesidade são altamente preocupantes e podem significar gigantesco ônus à sociedade, considerando-se a forte associação entre essas condições e grande número de doenças crônicas, como o câncer, o diabetes e doenças cardiovasculares. Diversos estudos já demonstraram que tanto a obesidade global quanto a obesidade abdominal estão independentemente associadas à doença cerebrovascular<sup>(4-8)</sup> e à doença coronária<sup>(4, 9, 10)</sup>. Além disso, o sobrepeso e a obesidade também se associam a mortalidade geral aumentada. Os estudos que avaliaram a correlação entre índice de massa corpórea (IMC) e mortalidade são em grande proporção marcados por resultados conflitantes, com alguns trabalhos inclusive sugerindo que o sobrepeso é benéfico. Essas inconsistências parecem derivar de fatores de confusão, como o tabagismo,

presença de doenças consumptivas, diferenças de idade, tempo de seguimento, entre outros. Amplas metanálises recentes, envolvendo diversos estudos prospectivos e grande número de indivíduos, permitem avaliação mais detalhada de todas essas questões com conclusões provavelmente mais precisas. O *Prospective Studies Collaboration* avaliou a associação entre IMC e mortalidade em 900.000 indivíduos e concluiu que tanto o sobrepeso quanto a obesidade se associam com aumento da mortalidade por todas as causas, sendo o IMC ótimo entre 22,5 e 25,0 (Kg/m<sup>2</sup>)<sup>(11)</sup>. Em outro estudo, avaliou-se a associação entre IMC e mortalidade geral em metanálise com 19 estudos prospectivos, incluindo 1,46 milhão de adultos (brancos) e mais de 160.000 mortes<sup>(12)</sup>. Em concordância com o *Prospective Studies Collaboration*, esse estudo concluiu que sobrepeso e obesidade (e possivelmente baixo peso) se associam com aumento da mortalidade por todas as causas em indivíduos aparentemente saudáveis e que nunca fumaram<sup>(12)</sup>.

O sobrepeso e a obesidade também estão associados a risco aumentado de várias outras comorbidades, como osteoartrite, depressão, gota, esteatose hepática, várias neoplasias, além de fatores de risco para doenças cardiovasculares, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e apnéia obstrutiva do sono<sup>(13, 14)</sup>.

## 1.1 Sobrepeso e Obesidade – Definições

Sobrepeso e obesidade são condições caracterizadas por adiposidade excessiva. A medida antropométrica mais comumente utilizada para a definição de sobrepeso e obesidade em humanos adultos é o IMC, definido como o peso do indivíduo (em quilogramas) dividido por sua altura ao quadrado (em metros). O indivíduo com IMC entre 25,0 e 29,9 Kg/m<sup>2</sup> é geralmente considerado como portador de sobrepeso, e aquele com IMC  $\geq$  30,0 Kg/m<sup>2</sup> é considerado obeso<sup>(4)</sup>. Apesar do IMC se correlacionar bem com a gordura corporal no âmbito populacional, existe grande heterogeneidade individual quanto à quantidade de gordura corporal e o risco de comorbidades diante de um determinado IMC<sup>(4)</sup>. Tal heterogeneidade deriva em grande parte de características como idade, sexo, etnia e genética, que se associam a diferenças na composição corporal e na distribuição da gordura corporal. A observação de que medidas antropométricas como a circunferência abdominal e a razão cintura-quadril, utilizadas como índices de acúmulo de gordura abdominal e obesidade central, se associam a risco aumentado de eventos cardiovasculares<sup>(15)</sup>, fortaleceu a hipótese da relevância da distribuição corporal da gordura em relação à quantidade de gordura *per se*.

A introdução de métodos de imagem como a tomografia computadorizada (TC) forneceu subsídios sofisticados para análise ainda mais precisa da contribuição do acúmulo regional de gordura. Estudos que mediram o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo visceral na região abdominal através de TC mostraram que o excesso de tecido adiposo visceral se associa mais fortemente a anormalidades metabólicas e a eventos cardiovasculares<sup>(16-</sup>

## **1.2 Fisiopatologia da Obesidade – Bases Inflamatórias**

### **1.2.1 A obesidade como doença inflamatória e o tecido adiposo como órgão endócrino**

O crescimento da obesidade em todo o mundo vem estimulando significativamente o estudo dessa condição e de suas complicações, desafiando conceitos outrora consolidados. Em 1993, Hotamisligil e colaboradores demonstraram expressão aumentada de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no tecido adiposo de roedores obesos em relação a controles não-obesos, e melhora da tolerância à glicose após neutralização do TNF- $\alpha$  nesse animais, achado que consistiu no primeiro indício claro de conexão entre obesidade, inflamação e diabetes<sup>(19)</sup>. O TNF- $\alpha$  é uma citocina próinflamatória capaz de ativar cascatas intracelulares que culminam com a inibição da ação da insulina, como será explicado adiante. Em modelos animais de obesidade, a ausência de TNF- $\alpha$  resulta em melhora da homeostase glicêmica e aumento da sensibilidade à insulina<sup>(20)</sup>, fortalecendo a hipótese de que a inflamação apresenta importante papel na regulação da ação da insulina na obesidade. O TNF- $\alpha$  também apresenta maior expressão no tecido adiposo e músculos de seres humanos obesos<sup>(21, 22)</sup>, além de induzir resistência à insulina quando infundido em humanos<sup>(23)</sup>. A constatação do envolvimento do TNF- $\alpha$  na fisiopatologia da obesidade e de suas complicações metabólicas contrariou o mero conceito de doença de depósito lipídico inerte conferido à obesidade<sup>(24)</sup>, inaugurando o estudo de imensa gama de outros mediadores

inflamatórios e hormonais no tecido adiposo em contexto de adiposidade excessiva<sup>(25)</sup>.

Dentre os hormônios secretados pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina e a adiponectina. A leptina é um hormônio predominantemente secretado por adipócitos, com níveis circulantes proporcionais à adiposidade corporal, com regulação pelo estado nutricional do indivíduo<sup>(26)</sup>. No período pós-prandial, os níveis de leptina se elevam, e através de ação central, inibem o apetite, e por ação tireoidiana, estimulam a termogênese e oxidação de ácidos graxos. Em situação de jejum, os níveis de leptina caem, e assim, o apetite aumenta e a termogênese fica limitada. Diferentemente de alguns modelos murinos de obesidade, caracterizados por deficiência de leptina ou mutação do receptor de leptina, a obesidade em humanos raramente se associa a esses defeitos genéticos, associando-se frequentemente a um quadro de resistência à leptina<sup>(27)</sup>.

A adiponectina é secretada por adipócitos e se encontra presente em altos níveis na circulação<sup>(28)</sup>. Suas concentrações plasmáticas apresentam relação inversa com o grau de obesidade, resistência insulínica e desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2<sup>(29, 30)</sup>. A adiponectina também apresenta diversas funções antiaterogênicas na parede vascular, como diminuição da expressão de moléculas de adesão e inibição da transformação de macrófagos em células espumosas<sup>(31, 32)</sup>. Camundongos ateroscleróticos deficientes em apolipoproteína E (ApoE) e tratados com adenovírus destinado ao aumento da expressão de adiponectina apresentaram redução da aterosclerose em relação aos controles<sup>(33)</sup>. Diferentes estudos também

demonstraram relação inversa entre níveis de adiponectina e eventos cardiovasculares<sup>(34)</sup>.

Além de hormônios, o tecido adiposo também é capaz de produzir inúmeros mediadores inflamatórios, como o já mencionado TNF- $\alpha$ , a proteína quimiotática de monócito (MCP-1) e a interleucina-6 (IL-6), entre outros <sup>(28)</sup>, conforme tabela abaixo.

**Tabela 1.** Adipocitocinas

Fatores	Status na obesidade	Comentários
Leptin	↑	Modula a ingesta alimentar e o gasto energético; obesidade caracterizada por resistência à leptina.
Adiponectin	↓	Anti-inflamatória, anti-diabética e anti-aterogênica.
Resistin	↑	Induz resistência insulínica. Em humanos, produzida principalmente por macrófagos.
RBP4	↑	Produzida pelo fígado e adipócitos. Níveis elevados se associam a resistência insulínica.
Visfatina	↑	Possível efeito insulino-mimético
TNF- $\alpha$	↑	Primeira citocina identificada no tecido adiposo de camundongos. Induz resistência insulínica.
IL-6	↑	Apesar do aumento de sua expressão no tecido adiposo de animais e humanos obesos, seu papel no metabolismo glicêmico permanece indefinido.
MCP-1	↑	Pode induzir aumento de inflamação no tecido adiposo e resistência insulínica, mas há resultados conflitantes.
aP2	↑	A secreção por adipócitos é regulada por lipólise. A neutralização da aP2 melhora o metabolismo glicêmico.
PAI-1	↑	Possível associação com a hipercoagulabilidade da obesidade

Adaptado de Rocha VZ, Libby P. *Thyroid*. 2008 Feb; 18(2):175-83

RBP4: proteína ligante de retinol 4; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina-6; MCP-1: proteína quimiotática de monócito 1; aP2: proteína do adipócito 2; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1

Investigando a fonte celular de citocinas e quimiocinas no tecido adiposo, trabalhos mais recentes apontam que os adipócitos não atuam isoladamente na produção local de mediadores inflamatórios, contando com a

participação fundamental de macrófagos nessa atividade<sup>(35, 36)</sup>. Essas células se acumulam no tecido adiposo de animais e humanos obesos, participando da secreção local de citocinas e quimiocinas importantes, e assim gerando e amplificando o processo inflamatório local, e facilitando a gênese da resistência insulínica relacionada à obesidade<sup>(37, 38)</sup>

Os macrófagos podem apresentar heterogeneidade significativa em sua função, a depender de fatores locais capazes de estimular programas distintos de ativação, com diferentes perfis de mediadores inflamatórios, marcadores de superfície e enzimas metabólicas<sup>(39)</sup>. Estudos *in vitro* definiram a existência de dois polos de ativação de macrófagos denominados M1 e M2. In vivo, os macrófagos teciduais provavelmente assumem estados de ativação intermediários entre os polos M1 e M2. Os macrófagos M1 ou macrófagos “classicamente ativados” são induzidos por mediadores proinflamatórios, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e apresentam produção aumentada de citocinas proinflamatórias (como o TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas de oxigênio (como óxido nítrico [NO])<sup>(39)</sup>. Já os macrófagos M2, ou “ativados por via alternativa”, são induzidos por outras citocinas como as interleucinas-4 e 13 (IL-4 e IL-13), e apresentam um perfil com expressão significativa de mediadores anti-inflamatórios, como a interleucina-10 IL-10<sup>(39, 40)</sup>. Os macrófagos M2 também apresentam produção aumentada de arginase, que pode competir com a arginina, necessária para a produção de NO. A evidência atual sugere que os macrófagos M2 participam da supressão de respostas inflamatórias e promoção do reparo tecidual.

Dados recentes já demonstraram que no tecido adiposo, os macrófagos também são heterogêneos. Lumeng e colaboradores encontraram



em camundongos com obesidade induzida por dieta hipercalórica uma população de macrófagos diferente da encontrada em camundongos não-obesos<sup>(41)</sup>. Macrófagos no tecido adiposo de animais não-obesos expressavam diversos genes característicos de macrófagos M2, como arginase-1 e IL-10. Já os macrófagos no tecido adiposo de camundongos obesos apresentavam menor expressão dos genes anteriores e maior expressão de genes característicos de macrófagos M1, como por exemplo o TNF- $\alpha$ <sup>(41)</sup>.

Com base em todas essas constatações, a obesidade vem conquistando um *status* de doença inflamatória crônica. Essa hipótese ganhou ainda mais força com a publicação de trabalhos que avaliaram o efeito da deficiência de genes inflamatórios sobre as complicações metabólicas da obesidade. Além do TNF- $\alpha$ , a supressão e/ou deleção de genes inflamatórios como a MCP-1<sup>(42)</sup> e integrantes da cascata inflamatória intracelular, como as quinases I $\kappa$ B (IKK)<sup>(43)</sup> e Jun N-terminal (JNK)<sup>(44)</sup> podem amenizar não apenas a inflamação local, como também apresentar efeito sistêmico, com melhora da tolerância à glicose e redução da resistência insulínica em camundongos obesos, fortalecendo a hipótese inflamatória na fisiopatologia das complicações metabólicas da obesidade.

### **1.2.2 Possíveis elos fisiopatológicos entre inflamação e resistência insulínica**

A insulina promove a entrada celular de glicose através da ligação ao seu receptor na superfície de células responsivas. Resumidamente, mediante a ligação da insulina ao seu receptor, integrantes da família dos chamados substratos do receptor de insulina (IRS) se tornam fosforilados em seus resíduos de tirosina. Esse processo desencadeia etapas seguintes de sinalização, resultando em translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) intracelular para a membrana celular, culminando dessa forma, com o transporte de glicose para dentro da célula. Por outro lado, quando a fosforilação de IRS-1 ocorre em resíduos de serina específicos, a associação normal entre o receptor de insulina e o IRS-1 pode ser impedida, inibindo assim a sinalização promovida pela insulina. A presença de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  ou de níveis séricos elevados de ácidos graxos livres pode ativar cascatas inflamatórias intracelulares envolvendo serina-quinases como JNK e IKK, que fosforilam resíduos de serina do IRS-1, prejudicando a sinalização pela insulina, e portanto, inibindo sua ação<sup>(45-47)</sup>. A indução de resistência insulínica pela sinalização inflamatória caracteriza o importante elo entre inflamação e resistência insulínica, consistindo em um dos mecanismos que explicam o dismetabolismo glicêmico na presença de uma condição inflamatória crônica como a obesidade.

### 1.2.3 Analogia entre aspectos inflamatórios da aterosclerose e da obesidade

A influência da inflamação na obesidade parece recapitular importantes aspectos fisiopatológicos de outras condições inflamatórias crônicas, como a aterosclerose. O processo aterosclerótico é hoje sabidamente inflamatório em todas as suas fases, desde a formação de uma “estria gordurosa” (do inglês, *fatty streak*) até a complicação trombótica do ateroma, base fisiopatológica das síndromes isquêmicas agudas. O envolvimento da inflamação na aterosclerose se baseia principalmente na ativação dos dois braços da imunidade, inata e adaptativa<sup>(48)</sup>.

A imunidade inata consiste na primeira e rápida linha de defesa do organismo e envolve vários tipos celulares, principalmente macrófagos<sup>(49)</sup>. Os macrófagos expressam receptores que reconhecem ampla gama de perfis moleculares comumente encontrados em patógenos. Esses receptores incluem receptores *scavengers*<sup>(50)</sup>, que induzem a endocitose e degradação de partículas, e os receptores *Toll-like* (TLRs)<sup>(51)</sup>, capazes de ativar vias inflamatórias intracelulares, como a via do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a via da proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), induzindo a expressão de genes envolvidos em produção de citocinas, recrutamento celular, geração de radicais livres e em fagocitose.

Na aterosclerose, os macrófagos representam importante elemento de amplificação da resposta inflamatória e progressão da placa. Após a internalização de lipoproteínas oxidadas através de receptores *scavengers*, os macrófagos se tornam células espumosas e podem interagir com células T

através de apresentação de antígeno. Por outro lado, os TLRs podem promover uma resposta inflamatória diretamente. Na placa aterosclerótica, a resposta à ligação ao TLR no macrófago provavelmente envolve a produção de citocinas inflamatórias e metaloproteinases e de radicais livres de oxigênio.

Embora os macrófagos sejam a grande maioria das células inflamatórias da placa aterosclerótica, os linfócitos, células da imunidade adaptativa, contribuem decisivamente para a evolução do ateroma<sup>(52, 53)</sup>. A imunidade adaptativa reconhece estruturas moleculares específicas e gera uma resposta inflamatória mais precisa do que o braço inato da imunidade. Nesse cenário, células T CD4<sup>+</sup> através dos chamados receptores de células T (TCR) reconhecem antígenos a elas apresentados pelas chamadas células apresentadoras de antígenos (como macrófagos e células dendríticas) via complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II). A partir da apresentação de antígeno via MHC II a uma célula T, ela pode assumir fenótipos distintos de ativação, e assim expressar diferentes perfis de citocinas.

Na placa aterosclerótica, embora menos numerosos, os linfócitos T são capazes de regular a resposta inflamatória inata, e portanto as funções dos macrófagos ali presentes, contribuindo para a progressão da lesão<sup>(37, 54, 55)</sup>. Em camundongos com deficiência de ApoE (e portanto, propensos à aterosclerose), e também imunodeficientes, observou-se redução significativa da doença em relação aos ApoE<sup>-/-</sup> imunocompetentes. A transferência de células T CD4<sup>+</sup> aos ApoE<sup>-/-</sup> imunodeficientes aumentou substancialmente as lesões ateroscleróticas<sup>(56)</sup>, sugerindo a grande relevância dessas células na aterogênese.

Em geral, as células T podem migrar para o interior da placa aterosclerótica, após contato inicial com antígenos apresentados por células dendríticas em linfonodos locais. Sua entrada no ateroma se faz através de diferentes quimiocinas, como o trio monocina induzida por interferon-gama (MIG) (ou CXCL-9), proteína induzida por interferon-gama (IP-10) (ou CXCL-10) e quimiocina alfa de célula T induzida por interferon (I-TAC) (ou CXCL-11), interagindo com seu receptor comum, CXCR3<sup>(57)</sup>. No interior da placa, as células T podem interagir com macrófagos através de apresentação de antígeno, diferenciando-se em subtipos com perfis distintos de produção de citocinas, sendo os mais clássicos o *T-helper 1* (Th1), representado por citocinas pró-inflamatórias potentes, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ , e o *T-helper 2* (Th2), representado por citocinas como a IL-4 e IL-13<sup>(54, 55)</sup>. Geralmente, em placas ateroscleróticas de camundongos e humanos, predomina o perfil Th1 da resposta imune adaptativa<sup>(55)</sup>.

O IFN- $\gamma$ , uma das mais representativas citocinas Th1, é capaz de aumentar a capacidade de macrófagos e células endoteliais de apresentar antígenos, e estimular a produção de mediadores inflamatórios como TNF e interleucina-1<sup>(58)</sup>. Essas citocinas agem sinergicamente e amplificam a inflamação, promovendo a produção de outros mediadores inflamatórios por macrófagos e células vasculares. Essas atividades em geral são pró-aterogênicas. De fato, camundongos ApoE<sup>-/-</sup> com deficiência de IFN- $\gamma$  ou do seu receptor apresentam redução significativa do desenvolvimento de aterosclerose<sup>(59, 60)</sup>.

As placas ateroscleróticas também apresentam citocinas com propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas, como a interleucina-10 (IL-

10) e o fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), secretadas predominantemente pelas chamadas células T regulatórias (Treg)<sup>(61)</sup>. As chamadas Treg são capazes de suprimir células efetoras Th1 e a inflamação na placa aterosclerótica. As células Treg são classicamente representadas por células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que amadurecem no timo. Além disso, as células Treg expressam especificamente FoxP3, fator de transcrição da família forkhead, que desempenha um papel fundamental na sua atividade supressiva. Embora as células Treg naturais sejam geradas durante o desenvolvimento do timo, elas também podem ser induzidas periféricamente durante as respostas imunes. Vários estudos tem demonstrado a presença de células Treg em placas ateroscleróticas de camundongos e humanos <sup>(62)</sup>. Extensa pesquisa também abordou o papel das células Treg na aterogênese utilizando diferentes estratégias, incluindo a depleção destas células por abordagens genética ou mediada por anticorpos, e de enriquecimento das células Treg por transferência adotiva. Ait-Oufella e colaboradores usaram algumas dessas abordagens experimentais e modelos distintos de camundongos para demonstrar um papel protetor das células Treg no desenvolvimento da aterosclerose <sup>(63, 64)</sup>.

Os possíveis mecanismos subjacentes à atividade ateroprotetora das células Treg são vários, incluindo tanto a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , quanto mecanismos dependentes do contato intercelular <sup>(62)</sup>.

Embora crucial na fisiopatologia da aterosclerose e de outras doenças inflamatórias crônicas, o papel dos linfócitos T na inflamação do tecido adiposo na vigência de obesidade foi ainda pobremente explorado. Wu e colaboradores

revelaram número superior de células T no tecido adiposo de camundongos obesos em comparação aos respectivos controles não-obesos<sup>(65)</sup>. Além disso, Kintscher demonstrou o paralelismo entre o surgimento de resistência insulínica e o acúmulo de células T no tecido adiposo visceral de camundongos que receberam dieta rica em gorduras<sup>(66)</sup>. Nesses animais, após 5 semanas de dieta rica em gorduras, houve redução substancial da sensibilidade à insulina, coincidindo com a presença de linfócitos T, mas não de macrófagos, no tecido adiposo visceral<sup>(66)</sup>. Os macrófagos foram detectados no tecido adiposo apenas após 10 semanas de dieta. A presença precoce dos linfócitos T no tecido adiposo concomitante com a detecção de resistência insulínica sugere um papel central dessas células na coordenação da rede inflamatória do tecido adiposo e subsequente desenvolvimento do quadro metabólico<sup>(66)</sup>. Em humanos, a expressão de mRNA de células CD3-positivas (representando linfócitos T) e de IFN- $\gamma$  em biópsias de tecido adiposo de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 se correlacionou significativamente com a circunferência abdominal, sugerindo possível associação de resistência insulínica em diabéticos com acúmulo de células T no tecido adiposo<sup>(66)</sup>.

Apesar da evidência do acúmulo de células T no tecido adiposo visceral de camundongos obesos em comparação aos não-obesos e da possível implicação dessas células nas complicações metabólicas associadas a obesidade, a real atuação da imunidade adaptativa e particularmente de citocinas Th1 como o IFN- $\gamma$ , no circuito inflamatório do tecido adiposo ainda não é conhecida.

#### 1.2.4 Possíveis mecanismos de acúmulo das células inflamatórias no tecido adiposo na obesidade

À demonstração da importância de macrófagos na inflamação do tecido adiposo em indivíduos obesos, seguiram-se estudos que delinearam os mecanismos de acúmulo local dessas células. Reconhecido produtor de MCP-1, o tecido adiposo secreta quantidades ainda mais abundantes desta quimiocina na presença de obesidade, sugerindo-se a participação da MCP-1 no recrutamento local de células inflamatórias nesse contexto. De fato, alguns estudos mostraram que animais obesos com deficiência de MCP-1 ou de CCR2, receptor de MCP-1, apresentam números reduzidos de macrófagos no tecido adiposo e maior sensibilidade à insulina quando comparados aos controles<sup>(42, 67)</sup>, sugerindo o envolvimento da dupla MCP-1 e CCR2 no tráfego celular local, e também no metabolismo sistêmico de glicose. Por outro lado, os mecanismos que controlam o tráfego de células T no tecido adiposo permanecem pouco explorados. O aumento da expressão da quimiocina RANTES (CCL5) e de seu receptor CCR5 no tecido adiposo obeso de camundongos e seres humanos sugere a participação de ambos no trânsito local de linfócitos T<sup>(65)</sup>, mas tal hipótese ainda requer evidência definitiva. Além disso, é interessante lembrar que RANTES é capaz de recrutar não apenas células T, mas também células dendríticas, células *natural killer* (NK), mastócitos, eosinófilos e basófilos para sítios de inflamação e infecção<sup>(68)</sup>. Em contrapartida, células efectoras Th1 e células T CD8 expressam seletivamente o receptor de quimiocina CXCR3, que como já foi anteriormente mencionado, é específico para as quimiocinas MIG, IP-10 e I-TAC. Aumento da expressão de



CXCR3 e seus ligantes ocorre em vasta gama de condições infecciosas e inflamatórias, incluindo a aterosclerose<sup>(57)</sup>. Animais com deficiência de ApoE e com deleção de CXCR3 ou de IP-10 desenvolvem significativamente menos aterosclerose do que animais com deficiência única de ApoE<sup>(69, 70)</sup>. Tratamento com antagonista de CXCR3 (NBI-74330) reduz a formação de placa aterosclerótica em associação com menor acúmulo de células T efetoras e também de macrófagos em lesões de camundongos ateroscleróticos deficientes em receptor de LDL<sup>(71)</sup>. Com base nessas várias observações, é razoável supor que CXCR3 e seus ligantes também desempenhem papel importante no acúmulo de células T no tecido adiposo na obesidade.

## **2 Objetivos**

---

- 2.1 Analisar a participação de células T, e mais especificamente da citocina Th1 IFN- $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo de camundongos obesos.
  
- 2.2 Avaliar a importância do receptor de quimiocinas CXCR3 no acúmulo de células T no tecido adiposo de camundongos obesos.

## **3      Materiais e Métodos**

---

### 3.1 Animais

Camundongos machos C57BL/6 (Taconics) e camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) (The Jackson Laboratory) receberam uma dieta pobre em lípidos (PicoLab Rodent Chow 5053; 13% de kcal provenientes de lípidos) durante período entre o desmame e 6 semanas de idade. A partir daí, os animais passavam a receber dieta rica em lípidos (D12108 from Research Diets; 40% kcal provenientes de lípidos; 1,25% de colesterol), na qual eram mantidos por 15 a 21 semanas (camundongos obesos). Os controles eram mantidos em dieta pobre em lípidos (controles não-obesos).

Camundongos machos com deficiência no receptor de IFN- $\gamma$  e apolipoproteína E (IFN $\gamma$ R $^{-/-}$ ApoE $^{-/-}$ ) e controles (ApoE $^{-/-}$ ) receberam dieta pobre em lípidos até 8 semanas de idade, quando passaram a receber dieta rica em lípidos por mais 8 semanas.

Na segunda fase do projeto, submetemos camundongos machos C57BL/6 (The Jackson Laboratory) e camundongos deficientes em CXCR3 (CXCR3 $^{-/-}$ ) (gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. Andrew Luster) a uma dieta pobre em lípidos (PicoLab Rodent Chow 5053; 13% de kcal provenientes de lípidos) durante período entre o desmame e 6-8 semanas de idade. Após esse período inicial, os animais receberam dieta rica em lípidos (D12108 from Research Diets; 40% kcal provenientes de lípidos; 1,25% de colesterol) por 8 ou 16 semanas.

Os modelos de camundongos utilizados estão representados na tabela

2.

**Tabela 2.** Modelos de camundongos utilizados

Camundongos	Dieta após 6-8 semanas de idade	Duração da dieta até o sacrifício	Procedimentos (tecido adiposo)	Procedimentos (sangue)
C57BL/6	LF (não-obesos)	15 ou 21 semanas	Citometria de fluxo Imunohistoquímica <i>Real-time PCR</i> Cultura organoide e ELISA	
C57BL/6	HF (obesos)	15 ou 21 semanas		
C57BL/6	LF (não-obesos)	15 semanas	Imunohistoquímica <i>Real-time PCR</i>	Curva de TOG Dosagem de adiponectina, leptina e colesterol
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	LF (não-obesos)			
C57BL/6	HF (obesos)			
IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>	HF (obesos)			
ApoE <sup>-/-</sup>	HF (obesos)	8 semanas	<i>Real-time PCR</i>	Dosagem de colesterol, triglicérides, e glicose
IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup> ApoE <sup>-/-</sup>				
C57BL/6	HF (obesos)	8 e 16 semanas	Citometria de fluxo Imunohistoquímica <i>Real-time PCR</i>	Curva de TOG Dosagem de adiponectina, leptina, insulina, e colesterol
CXCR3 <sup>-/-</sup>				

Abreviações: LF: *low-fat diet* (dieta pobre em gordura); HF: *high-fat diet* (dieta rica em gordura); TOG, tolerância oral à glicose

Finalizado o período determinado de dieta, os animais eram sacrificados. No dia do sacrifício, os animais receberam dose intraperitoneal de heparina e foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (2,5 mg/10 g de peso corporal). Após a supressão de seus reflexos profundos pela anestesia, os animais foram submetidos a pericardiocentese para coleta de 1 ml de sangue, seguida de amputação de átrio direito e infusão de salina via ventrículo esquerdo para lavagem. O procedimento era finalizado após coleta de tecido adiposo perigonadal ou outro órgão a ser utilizado.

Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo *Standing Committee on Animals* da Harvard Medical School, Boston, Estados Unidos.

### **3.2 Análise por citometria de fluxo de células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo**

Com o objetivo de quantificar as várias populações de células inflamatórias no tecido adiposo, a citometria de fluxo foi realizada em células isoladas a partir de tecido adiposo periepididimal de camundongo, em suspensão com anticorpos conjugados. Um grama (1 g) desse tecido foi cortado em pequenos fragmentos e digerido em solução de PBS (*phosphate buffered saline*) contendo 2% de albumina bovina sérica e 250 U/ml de colagenase tipo II (Worthington) por 1 hora a 37°C. O tecido digerido foi passado por um filtro de 70 µm (BD Biosciences), e o filtrado resultante foi centrifugado. Em seguida, houve aspiração do sobrenadante e lise de hemácias com solução ACK (*ammonium-chloride-potassium*) para lise (Gibco) através de breve incubação por 2 minutos. As células remanescentes (conhecidas como células estromais vasculares) foram lavadas com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino a 10%, contadas, e distribuídas em tubos de citometria de fluxo, de forma que cada tubo tivesse em média 250.000 a 500.000 células. Em seguida, as células foram incubadas por 10 minutos com Fc Block (Pharmingen) em solução de PBS contendo albumina bovina sérica a 1% (para bloqueio de sítios

de ligação inespecífica), e finalmente marcadas com anticorpos conjugados para F4/80, CD3, CD4, CD8, CD11c e B220 ou seus respectivos controles em incubação de 30 minutos. Ao final desse processo, as células foram lavadas e deixadas em solução de PBS contendo albumina bovina sérica a 1% e formalina a 1% para fixação. No dia seguinte, as amostras foram analisadas através de FACScan.

O baço é importante reservatório de células inflamatórias. Para quantificar as várias categorias de células inflamatórias no baço de diferentes grupos de animais (e assim analisar a influência desse órgão no pool celular sistêmico), células derivadas do baço (esplenócitos) também foram utilizadas para análise por citometria de fluxo. Nesse experimento, após sacrifício do animal, o baço foi rapidamente removido e mergulhado em meio gelado. Em seguida, o tecido foi passado por filtro e processado da forma descrita no parágrafo anterior. Ao final do procedimento, as células isoladas também foram marcadas com os mesmo anticorpos conjugados e seus respectivos controles, e analisadas por FACS.

### **3.3 Análise por imunohistoquímica de células inflamatórias derivadas de tecido adiposo**

Tecido adiposo periepididimal de camundongos foi fixado em periodato-lisina-paraformaldeído (como descrito previamente)<sup>(72)</sup>, e emblocado em parafina. Secções de 5 micra foram incubadas com anticorpos derivados de rato contra CD45, Mac-3, I-A<sup>b</sup> (BD Pharmingen) e CD3 (Abcam) de



camundongo, e a seguir incubadas com anticorpos secundários biotinilados e finalmente, com complexo avidina-biotina (Vector). A reação era visualizada com 3-amino-9-ethyl carbazol (Dako). As secções eram submetidas a contra-coloração com solução de hematoxilina de Gill (Sigma). Células positivas foram contadas em 10 campos visuais consecutivos sob a mesma magnificação microscópica.

### **3.4 Citometria de fluxo com coloração intracelular de células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo**

Nesse experimento avaliou-se a capacidade de produção de IFN- $\gamma$  (frente a estímulos inflamatórios) por células derivadas de tecido adiposo de animais obesos e controles. Números iguais de células estromais vasculares isoladas de tecido adiposo periepididimal de camundongos obesos e controles foram incubadas a 37° C em meio com Brefeldina A (BD Biosciences) a 10  $\mu$ g/mL (para promover o acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático e inibir a sua secreção) com ou sem 10 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma) e 1  $\mu$ g/mL de ionomicina (Sigma), utilizados para estimulação celular inespecífica e produção de citocinas. Depois de 4 horas de incubação, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD3 conjugados (eBioscience), fixadas e permeabilizadas com kit BD Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences), marcadas com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  conjugados (BD Pharmingen), e analisadas por citometria de fluxo.

### 3.5 Cultura e diferenciação de células 3T3-L1

Para avaliar a influência do IFN- $\gamma$  sobre os adipócitos, células da linhagem murina de pré-adipócitos denominada 3T3-L1 foram cultivadas e transformadas em adipócitos maduros, e a seguir estimuladas com essa citocina.

Essas células foram cultivadas e diferenciadas ao longo de 11 dias através de protocolo modificado de estudos anteriores <sup>(73)</sup>. Em linhas gerais, as células 3T3-L1 foram cultivadas em meio DMEM contendo altos níveis de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após atingir confluência (dia 0), as células foram estimuladas com DMEM contendo soro fetal bovino a 10%, 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma) a 0,5 mmol/L, dexametasona (Sigma) a 1  $\mu$ mol/L, e insulina porcina (Sigma) a 10  $\mu$ g/ml, para induzir diferenciação. No dia 2, o meio foi substituído por DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% e insulina porcina a 10  $\mu$ g/ml, e novamente substituído por meio fresco de mesma composição a cada 48 horas. No dia 11, quando as células já se encontravam diferenciadas em adipócitos maduros, foram estimuladas com IFN- $\gamma$  recombinante de camundongo (Chemicon) a 10, 50, ou a 100 U/ml, e finalmente coletadas 24 horas após estimulação.

### 3.6 Cultura Organóide

Aproximadamente 350 mg de tecido adiposo periepididimal foram extraídos de animais C57BL/6 recebendo dieta rica em lípidos, cortados em pequenos fragmentos, e incubados com meio de cultura isolado, ou meio contendo 100 U/ml de IFN $\gamma$  recombinante de camundongo. Após 6 horas de incubação a 37° C, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas.

### 3.7 Efeitos das Células T sobre Adipócitos Maduros

Células T CD4<sup>+</sup> foram positivamente selecionadas e isoladas de baço de camundongos C57BL/6, cultivadas e ativadas *in vitro*. Em linhas gerais, baços de 3 animais foram isolados, rapidamente imersos em meio gelado, e passados contra um filtro de 70  $\mu$ m. O filtrado resultante (contendo as células esplênicas) foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, seguindo-se aspiração do sobrenadante e lise de hemácias através de breve incubação com solução ACK para lise (Gibco). As células foram lavadas em meio fresco e contadas para serem submetidas à seleção positiva das células T CD4<sup>+</sup>, e a seguir ao protocolo de ativação.

Uma vez isoladas, as células T CD4<sup>+</sup> foram cultivadas *in vitro* com 2  $\mu$ g/ml de anti-CD28 (Bioexpress) e 10 ng/ml de IL-12 recombinante de camundongo (R&D Systems) em placa de cultura coberta com 5  $\mu$ g/ml de anti-CD3 (BD Pharmingen). Após 48 horas de incubação a 37° C, as células foram

transferidas para placas frescas e incubadas com 10 U/ml de IL-2 recombinante de camundongo (R&D Systems) por 72 horas. As células foram então lavadas e novamente incubadas em placa coberta com anti-CD3. Após 48 horas, meio proveniente da cultura de células T CD4<sup>+</sup> ativadas foi usado para estimular células 3T3-L1 previamente diferenciadas, por 24 horas, e na presença ou ausência de anticorpos neutralizantes anti-IFN $\gamma$  na concentração de 10  $\mu$ g/ml. Após estimulação, meio proveniente das células 3T3-L1 foi utilizado para dosagem de citocinas.

### **3.8 Determinações Metabólicas e Dosagem de Citocinas**

As quimiocinas IP-10 e MIG, e a adiponectina foram dosadas através dos kits de ELISA *Quantikine* (R&D Systems). Níveis plasmáticos de leptina também foram medidos através de kit de ELISA (Crystal Chem). As concentrações de MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, e IL-12 foram medidas em citômetro de fluxo através do kit *BD Cytometric Bead Array* (BD Biosciences). Os níveis plasmáticos de colesterol total e glicose foram determinados por métodos colorimétricos enzimáticos (Wako).

Para a realização dos testes de tolerância à glicose, os camundongos foram mantidos em jejum por 12 horas e a seguir, submetidos à administração intraperitoneal de glicose (Sigma) (1mg/g de peso corporal). Sangue coletado a partir da veia caudal foi utilizado para a medida seriada de glicose através de glucômetro capilar (OneTouch Ultra, LifeScan) no minuto 0, e aos 20, 40, 60, 90 e 120 minutos que se seguiram à administração de glicose.

### 3.9 Análise de Perfil de Transcrição (*Microarray*)

Células 3T3-L1 diferenciadas foram tratadas com 100 U/ml de IFN $\gamma$  por 4 horas ou 24 horas, ou deixadas sem tratamento durante períodos de mesma duração (controles). RNA total foi isolado de 5 a 6 placas de cultura diferentes (de ambas as condições: tratamento e controle), através de RNeasy Mini Kit (Qiagen). 10  $\mu$ g de RNA foram usados no rastreamento de microarray utilizando-se a membrana Mouse Expression Array 430 2.0 da Affymetrix. Os dados foram capturados através da utilização do laboratório de sistemas de manejo de informação de membrana genética da Affymetrix. Os critérios diferenciais de regulação pelo tratamento com IFN $\gamma$  basearam-se no valor de t-statistic > 2 associado a um valor de p < 0.05. Os genes com atividade quimiotática foram agrupados através de uma aplicação d Chip e classificados de acordo com seus valores de probabilidade no período de 24 horas <sup>(74)</sup>.

### 3.10 Quantificação da Expressão Gênica através de PCR Quantitativo

Após isolamento e pesagem do tecido adiposo visceral periepididimal dos animais, foi realizada separação de até 500 mg desse tecido, que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e a seguir conservado a -80°C.

Para extrair o RNA do tecido adiposo, foi utilizado o *RNeasy Lipid Tissue Midi kit* (Qiagen). As amostras de tecido adiposo foram mergulhadas em reagente para lise fornecido pelo fabricante (*QIAzol lysis reagent*), e a seguir submetidas a ruptura mecânica através de homogenizador por 60 segundos.

Após adição de clorofórmio, o homogenato foi então separado em fases aquosa e orgânica por centrifugação. A fase aquosa (superior) foi extraída, e etanol foi adicionado para permitir condições apropriadas de ligação. A amostra foi transferida para a coluna RNeasy fornecida pelo fabricante, em que o RNA total se liga à membrana, enquanto o fenol e outros contaminantes são “lavados”. A digestão de DNase na própria coluna também foi realizada, conforme orientações do fabricante. Ao final do procedimento de extração, RNA de alta qualidade foi eluído com água livre de RNase, e conservado a -80°C. A concentração e a pureza do RNA foram avaliados utilizando-se o espectrofotômetro *Nanodrop 1000 UV* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Quantidades iguais de RNA foram submetidas a transcrição reversa através de Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 1 micrograma de RNA total de cada amostra foi utilizado para síntese de cDNA. RNA e primers de oligo-dT foram incubados por 5 minutos a 65°C para permitir o anelamento dos primers. A seguir, os tubos foram suplementados com uma mistura contendo: tampão 10x, DTT 0.1 M, dNTPs 10mM, RnaseOut, e Superscript II (todos da Invitrogen). O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C até sua utilização.

O PCR quantitativo foi realizado através do Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real MyiQ *Single Color* (Bio-Rad), utilizando-se SYBR Green como agente de detecção. As sequências de primers foram desenhadas utilizando-se uma biblioteca de design de primers, a *Universal ProbeLibrary Assay Design Center from Roche Applied Science* (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/adc.jsp>). As sequências de primers utilizados estão

listadas em tabela apresentada no anexo A. Os níveis de mRNA dos vários genes foram normalizados utilizando-se o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle interno em todos os experimentos.

Os valores foram extraídos das curvas de amplificação fornecidos pelo software do próprio Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real MyiQ. As razões de expressão relativa de cada gene foram calculadas utilizando-se o programa REST (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>), com GAPDH como gene de referência.

### **3.11 Calorimetria Indireta, Atividade Física, e Ingesta Alimentar**

Os camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais sob ciclo de 12 horas de luz/escuridão, com acesso a dieta e água ad libitum. As gaiolas apresentavam sistema de controle de temperatura *Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System* (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Os camundongos foram submetidos a monitoramento não-invasivo de troca gasosa, atividade física, e ingesta alimentar. Índices (ml/kg/h) de consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) e produção de  $CO_2$  ( $VCO_2$ ) foram determinados a intervalos de 11 minutos e normalizados para o peso corporal. Valores de índice de troca respiratória (respiratory exchange ratio, RER) foram calculados como  $VO_2/VCO_2$ . Atividades físicas foram medidas através de sensores de luz instalados na base das gaiolas.

Esses experimentos foram realizados através de colaboração com o Dr. David E. Cohen.

### 3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, California) ou Excel (Microsoft). Os valores nos gráficos representam média  $\pm$  desvio-padrão, sendo o n variável e indicado na legenda de cada figura. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste t de Student (Student's t test), a não ser quando especificado. Todos os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## **4 Resultados**

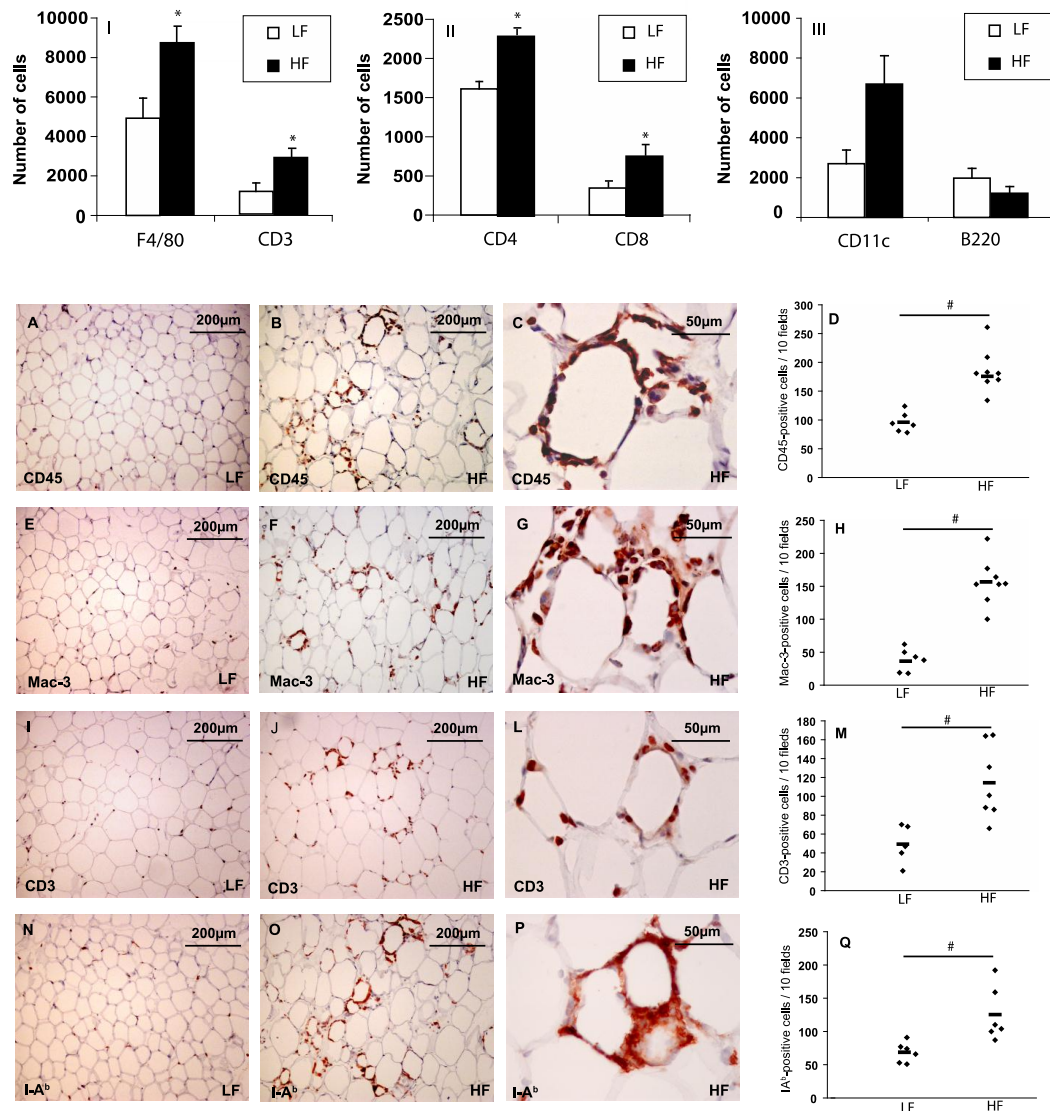
---

**Referentes ao objetivo 1: Analisar a participação de células T, e mais especificamente da citocina Th1 IFN- $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo.**

#### **4.1 Células T são mais numerosas em tecido adiposo de camundongos obesos do que em tecido adiposo de seus respectivos controles**

Como esperado, camundongos C57BL/6 que consumiram dieta rica em lípidos apresentaram maior peso corporal e tecido adiposo periepididimal mais volumoso do que os controles que receberam dieta pobre em lípidos (média de peso corporal após 15 semanas de dieta pobre ou rica em lípidos: 32,7 g vs 46,3 g, respectivamente; após 21 semanas: 31,7 g vs 44,4 g, respectivamente;  $p < 0,01$ ). Em concordância com estudos prévios, o tecido adiposo proveniente de animais obesos (HF, ou *high fat*) apresentou mais macrófagos (células positivas para F4/80) do que o tecido adiposo de controles (LF, ou *low fat*), de acordo com determinação por citometria de fluxo (figura 1, I). Tecido adiposo de animais obesos também apresentou mais células positivas para CD3, marcador de linfócitos T (figura 1, I), e também células T de ambas as subpopulações, CD4 e CD8 (figura 1, II). O grupo obeso também apresentou tendência a apresentar mais células positivas para CD11c, marcador de células dendríticas, mas a diferença não atingiu significância estatística (figura 1, III). O número de células B não foi diferente entre os dois grupos (figura 1, III).

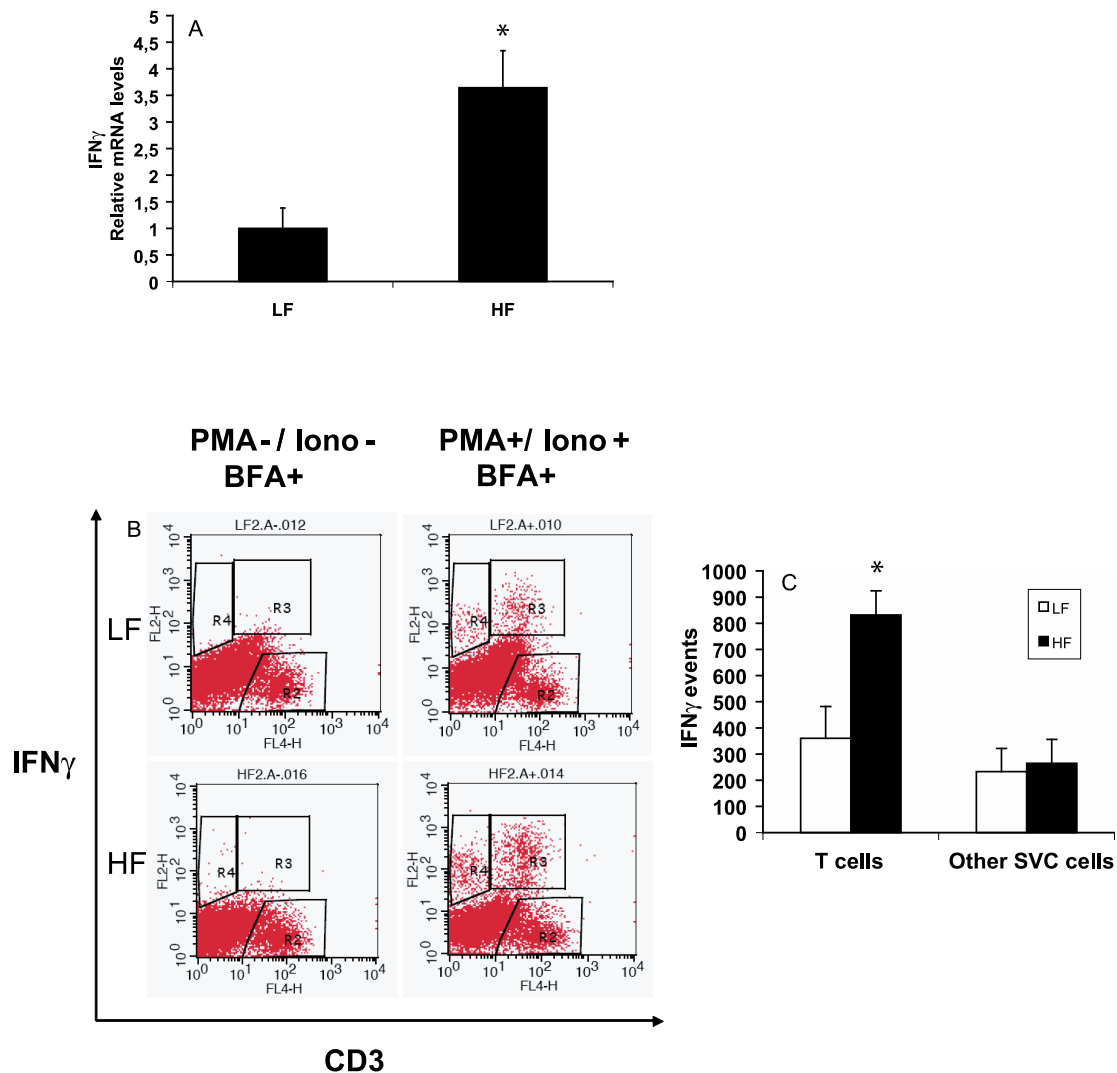
A análise quantitativa de células inflamatórias por imunohistoquímica em camundongos C57BL/6 após 21 semanas de dieta rica ou pobre em lípidos gerou achados concordantes com os resultados da citometria de fluxo. O tecido adiposo de camundongos obesos (HF) apresentou mais células positivas para CD45 (marcador de leucócitos), Mac-3 (marcador de macrófagos), ou CD3, do que o tecido adiposo de camundongos controles não-obesos (LF) (figura 1A-1M). O tecido adiposo do grupo obeso também apresentou mais células expressando I-A<sup>b</sup>, representando o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) em camundongos (figura 1N-1Q), indicando um estado exacerbado de ativação imune no tecido adiposo de camundongos obesos comparados aos não-obesos.



**Figura 1. Tecido adiposo visceral de camundongos obesos apresenta maior número de células inflamatórias do que o tecido adiposo de controles não-obesos.** Células estromais vasculares de tecido adiposo periepídídimo de animais C57BL/6 obesos e não-obesos foram marcadas com anticorpos para F4/80, CD3 (I), CD4 e CD8 (II), CD11c e B220 (III), e quantificadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam os números médios de células inflamatórias no tecido adiposo de camundongos não-obesos, ou seja, que receberam dieta pobre em gordura (LF) e camundongos obesos, que receberam dieta rica em gordura (HF). \*  $p < 0,05$  vs LF, calculado pelo *Student's t test*. Imunohistoquímica de tecido adiposo periepídídimo com anticorpos anti-CD45 (A-C), anti-Mac-3 (E-G), anti-CD3 (I-L), and anti-I-A<sup>b</sup> (N-P) foi realizada como descrito no texto. Os gráficos (D, H, M, e Q) representam os números de células positivas em cada grupo, com p calculado pelo *Student's t test*. Magnificação original: x100 (A, B, E, F, I, J, N, e O); x400 (C, G, L, e P). #  $p < 0,05$  vs LF (n=5 a 8).

#### **4.2 A expressão de IFN- $\gamma$ no tecido adiposo aumenta em camundongos obesos**

Extratos de tecido adiposo de animais obesos (HF) apresentaram níveis de mRNA de IFN- $\gamma$  mais altos do que extratos de controles não-obesos (LF), após 21 semanas de dieta rica ou pobre em gorduras, respectivamente (figura 2A). Células estromais de tecido adiposo isoladas de camundongos obesos e não-obesos apresentaram níveis proteicos intracelulares desprezíveis de IFN- $\gamma$ , como demonstrado por citometria de fluxo após tratamento com brefeldina A para bloquear a secreção. Entretanto, após estimulação com PMA e ionocina, as células T (positivas para CD3) isoladas de tecido adiposo de camundongos obesos produziram significativamente mais IFN- $\gamma$  do que aquelas de controles não-obesos (figuras 2B e 2C). O número de outras células produtoras de IFN- $\gamma$  não diferiu entre os 2 grupos de camundongos.



**Figura 2.** A expressão de IFN- $\gamma$  no tecido adiposo aumenta em camundongos sujeitos a obesidade induzida por dieta. **A**, RNA foi extraído de tecido adiposo visceral de camundongos C57BL/6 que receberam dieta pobre (LF) ou rica em gorduras (HF) por 21 semanas. PCR quantitativo por transcrição reversa (RT-qPCR) mediu os níveis de mRNA de IFN- $\gamma$  sobre GAPDH em ambos os grupos (n=10, cada grupo). **B**, células estromais vasculares isoladas de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 que receberam dieta LF ou HF por 15 semanas foram marcadas com anticorpos para CD3 e IFN- $\gamma$  após incubação com (à direita) ou sem (à esquerda) PMA e ionomicina. **C**, o gráfico representa os números de células T (e também de outras células) positivas para IFN- $\gamma$  em ambos os grupos, LF e HF. \*  $p < 0,05$  vs LF, calculado pelo *Student's t test*.

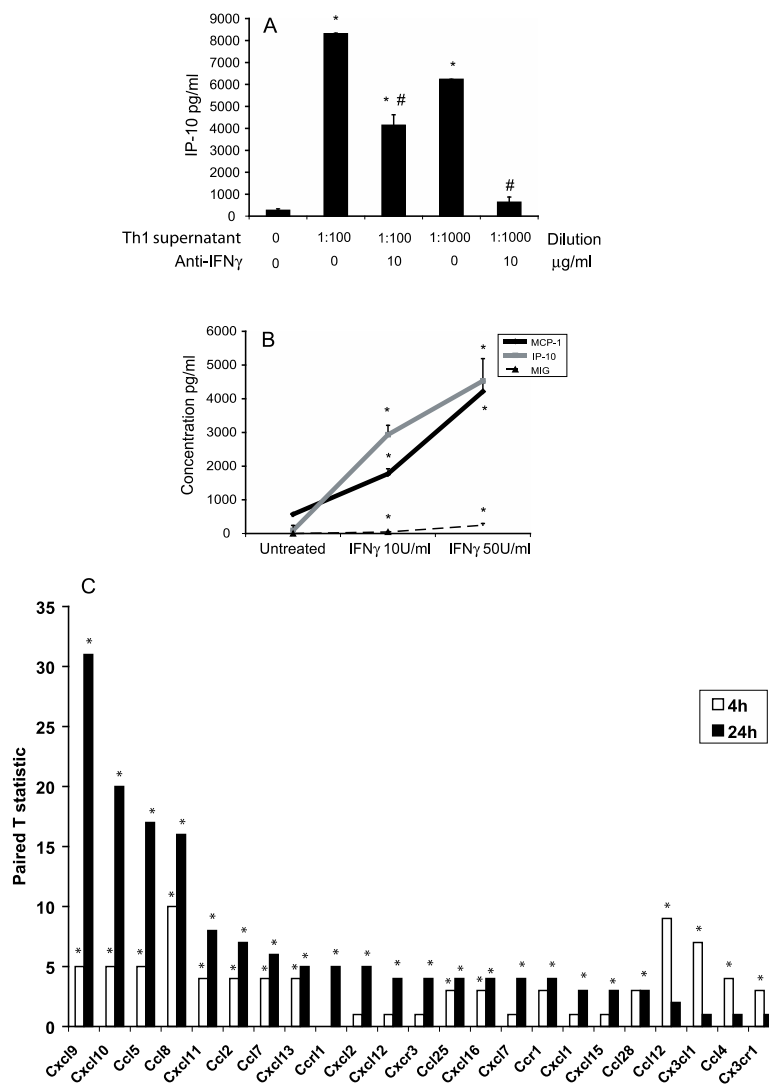
### 4.3 IFN- $\gamma$ estimula a expressão de quimiocinas por células 3T3-L1 *in vitro*

A presença de IFN- $\gamma$  no tecido adiposo motivou a investigação acerca da atuação local dessa citocina. Considerando a abundância e importância dos adipócitos no tecido adiposo, nosso próximo passo foi avaliar o possível impacto do IFN- $\gamma$  sobre essas células. Para tanto, testamos se adipócitos 3T3-L1 diferenciados poderiam produzir mediadores inflamatórios (como quimiocinas e citocinas) *in vitro* após estimulação com produtos das células T CD4<sup>+</sup> em cultura ou com IFN- $\gamma$  recombinante.

Quando incubadas com sobrenadante de células T CD4<sup>+</sup> murinas ativadas conforme protocolo descrito na seção de métodos, células 3T3-L1 diferenciadas produziram significativamente mais IP-10 (quimiocina de células T) (figura 3A). A seguir, utilizamos anticorpos anti-IFN- $\gamma$  para analisar a contribuição do IFN- $\gamma$  (dentre os produtos secretados pelas células T CD4<sup>+</sup> ativadas) para o aumento na expressão de IP-10. De fato, anticorpos anti-IFN- $\gamma$  limitaram a liberação de IP-10 de adipócitos 3T3-L1 (figura 3A). Similarmente, adipócitos 3T3-L1 estimulados com IFN- $\gamma$  murino recombinante, mesmo em doses tão baixas como 10 U/ml, produziram níveis significativamente aumentados das quimiocinas IP-10 e MIG, assim como da quimiocina de monócitos MCP-1 (figura 3B). Níveis de IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  não se modificaram significativamente após a estimulação de adipócitos 3T3-L1 com IFN- $\gamma$  (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que o IFN- $\gamma$  regula a expressão de genes inflamatórios seletivamente em adipócitos.

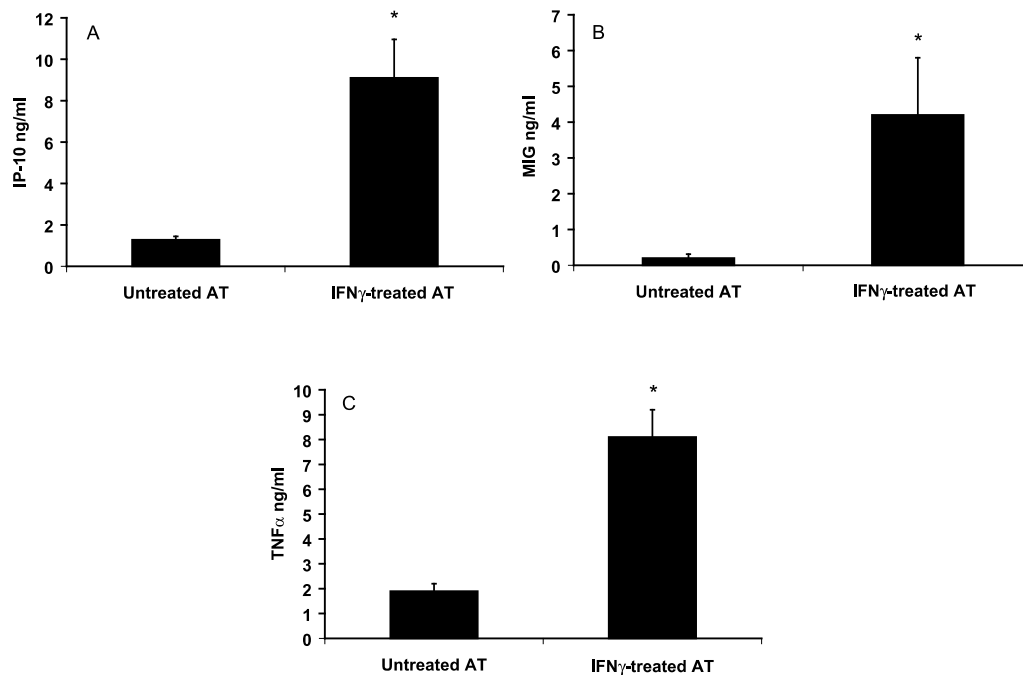
Considerando-se os resultados acima, realizamos uma análise mais ampla dos efeitos do IFN- $\gamma$  na expressão gênica em adipócitos através do perfil transcricional de células 3T3-L1 tratadas com 100 U/ml de IFN- $\gamma$  por 4 e 24 horas. Comparados aos controles, adipócitos estimulados com IFN- $\gamma$  apresentaram aumento significativo da produção de várias quimiocinas das famílias CC e CXC (figura 3C e anexo B). Em concordância com nossos resultados anteriores, a estimulação com IFN- $\gamma$  aumentou significativamente não apenas a expressão das quimiocinas de células T, como IP-10, MIG e I-TAC, como também de outras quimiocinas, como MCP-1 e RANTES.





**Figura 3. O IFN $\gamma$  estimula a expressão de quimiocinas em células 3T3-L1.** **A**, células 3T3-L1 foram incubadas com diferentes diluições de meio de cultura de células Th1, com ou sem 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IFN $\gamma$ . Níveis de IP-10 foram medidos no sobrenadante. O gráfico mostra a concentração de IP-10, com p calculado pelo Student's t test. \*  $p < 0,05$  vs controle (Th1 0/anti-IFN $\gamma$  0). #  $p < 0,05$  vs barra precedente. **B**, células 3T3-L1 foram estimuladas com diferentes concentrações de IFN $\gamma$  recombinante de camundongo. Concentrações proteicas de MCP-1, IP-10, e MIG foram medidas no sobrenadante. **C**, células 3T3-L1 foram estimuladas com 100 U/ml de IFN $\gamma$  ou deixadas sem tratamento. Após 4 e 24 horas, as células foram coletadas e o mRNA utilizado em screening de microarray. As barras brancas representam os valores de t statistic após 4 horas; as barras pretas, após 24 horas de estimulação com IFN $\gamma$ , em relação à expressão em células não-tratadas ( $n=5$  ou 6). \*  $p < 0,05$  vs não-tratadas.

Paralelamente aos resultados da estimulação de células 3T3-L1 individuais com IFN- $\gamma$ , a incubação de tecido adiposo perigonadal de camundongo com essa citocina em cultura também aumentou significativamente a secreção de IP-10 e MIG (figuras 4A e 4B). Além disso, o meio proveniente da cultura do tecido adiposo tratado com IFN- $\gamma$  apresentou níveis mais altos de TNF- $\alpha$  do que o meio de cultura de controles não-tratados (figura 4C), em contraste aos experimentos com adipócitos 3T3-L1 em cultura. Esses resultados diferentes provavelmente derivaram da presença no tecido adiposo de outras células além dos adipócitos, como células inflamatórias (macrófagos, por exemplo), consideradas fonte importante de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo.



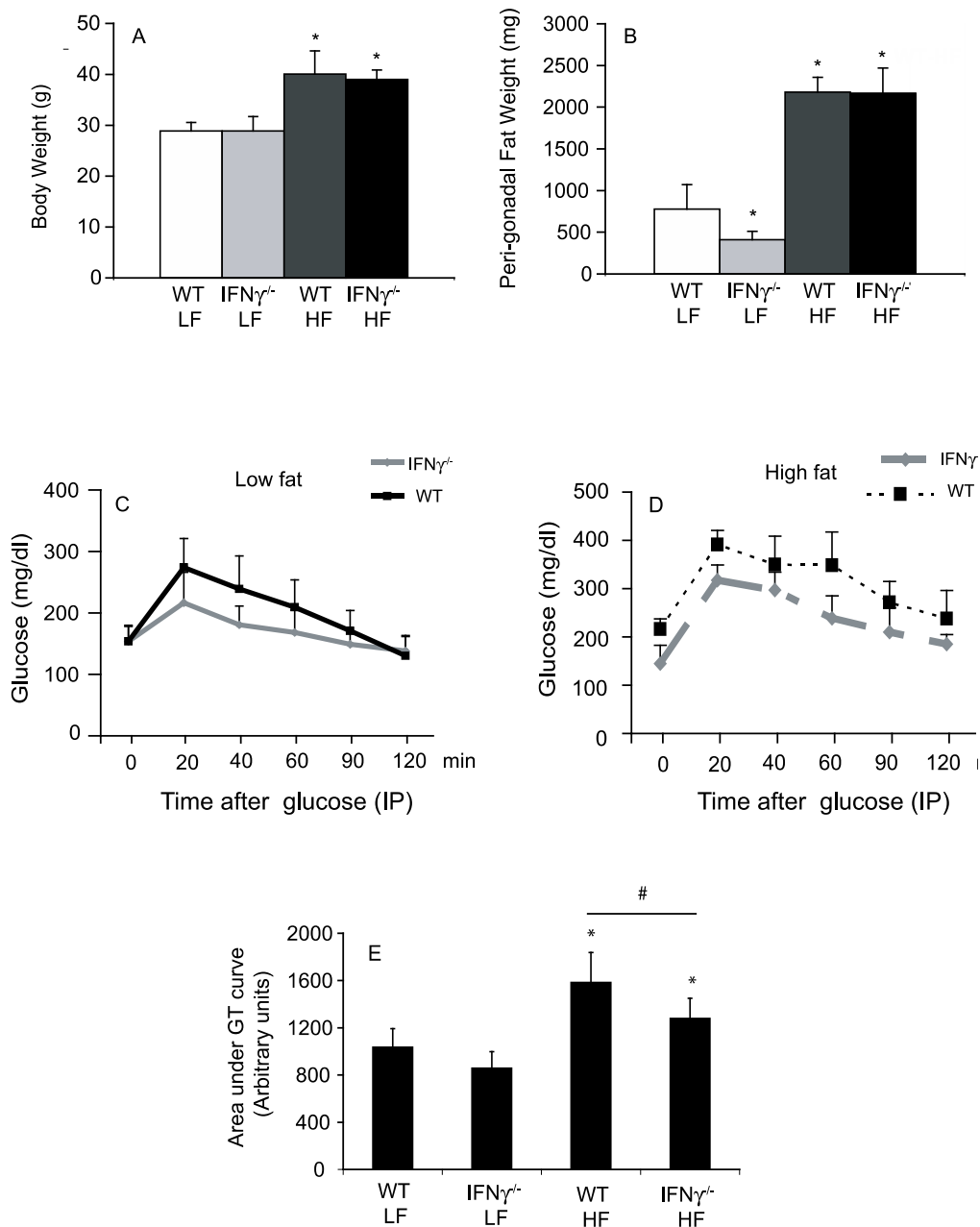
**Figura 4. IFN $\gamma$  induz a expressão de citocinas pelo tecido adiposo em cultura.** O tecido adiposo periepídídimo cortado em diminutos pedaços foi incubado com meio de cultura isoladamente (*untreated AT*) ou com 100 U/ml de IFN- $\gamma$  (*IFN $\gamma$ -treated AT*) por 6 horas a 37° C. Níveis de IP-10, MIG, e TNF- $\alpha$  (A-C) foram dosados no sobrenadante (n=3). \* p≤0,01 vs tecido adiposo não-tratado, calculado pelo *Student's t test*.

#### 4.4 A deficiência de IFN- $\gamma$ em camundongos limita a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo e aumenta a tolerância à glicose *in vivo*

Para aprofundar os resultados dos estudos *in vitro* sobre os efeitos do IFN- $\gamma$  no tecido adiposo, realizamos estudos *in vivo*, utilizando camundongos machos deficientes em IFN- $\gamma$  (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>) e controles C57BL/6 (WT). Ambos os grupos de camundongos consumiram dieta pobre (LF) ou rica em gorduras

(HF) por 15 semanas. Os grupos que receberam dieta rica em gorduras apresentaram peso significativamente maior do que aqueles que receberam dieta pobre em gorduras, mas o peso não foi diferente entre os grupos de camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  e controles que receberam a mesma dieta (figura 5A). Camundongos que receberam dieta rica em gorduras apresentaram também gordura periepídídimal mais pesada do que aqueles que consumiram dieta pobre em gorduras (figura 5B). Interessante notar que no grupo de animais não-obesos (LF), os camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  apresentaram gordura periepídídimal menos pesada do que seus respectivos controles (figura 5B).

Os camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  e controles que receberam dieta pobre em gorduras (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>/LF e WT/LF) apresentaram curvas de tolerância à glicose estatisticamente similares entre si (figuras 5C e 5E). No entanto, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  obesos (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>/HF) apresentaram tolerância à glicose significativamente maior do que seus respectivos controles obesos (WT/HF) (figuras 5D e 5E).

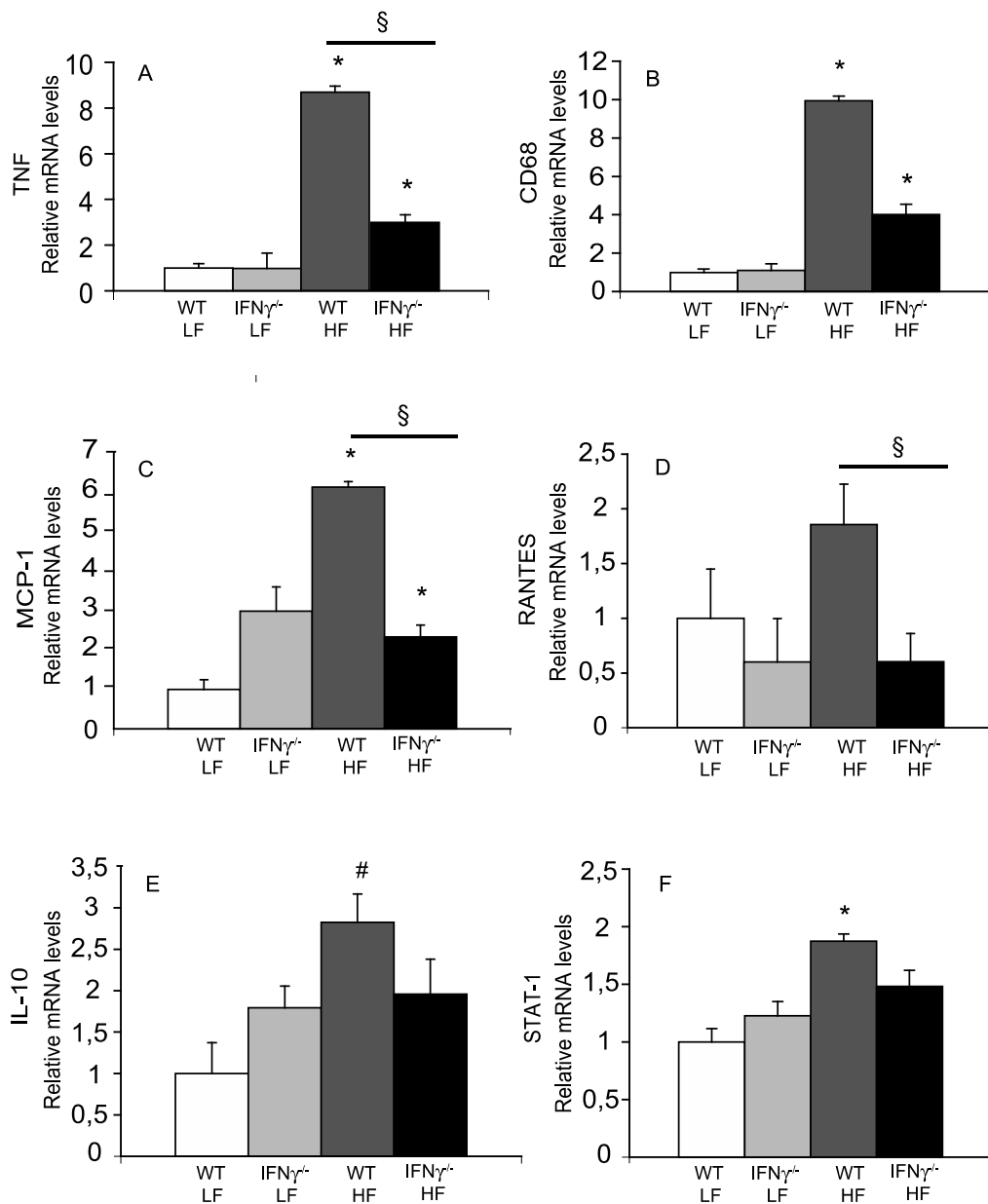


**Figura 5. A deficiência de IFN- $\gamma$  não altera o peso corporal, mas melhora a tolerância à glicose em camundongos obesos.** A e B representam o peso corporal e o peso da gordura periepídida, respectivamente. As barras representam os números médios de cada grupo, e a comparação entre eles foi feita através do Student's t test. C e D, curvas médias de tolerância à glicose de ambos os grupos não-obesos (figura 5C), e dos grupos obesos (figura 5D). A área sob a curva de tolerância à glicose foi calculada para cada camundongo, e a média de cada grupo representada em E, com a comparação entre os grupos feita através do Student's t test. WT/LF, controles não-obesos; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>LF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  não-obesos; WT/HF, controles obesos; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>HF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  obesos. \*  $p \geq 0,05$  vs WT/LF; #  $p \geq 0,05$  (n=5-6).

Como demonstrado por outros autores, a obesidade induzida por dieta resulta em aumento da expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo. Por exemplo, a expressão do mRNA que codifica CD68, marcador de macrófagos, e do mRNA que codifica TNF- $\alpha$ , aumentou no tecido adiposo de controles obesos quando comparados aos controles não-obesos, como já mostrado previamente<sup>(35, 36)</sup>.

O grupo de camundongos obesos e deficientes em IFN- $\gamma$  apresentou expressão menor de CD68 e TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo de controles obesos (figuras 6A e 6B), apesar do peso similar entre os grupos. Além disso, os camundongos obesos e deficientes em IFN- $\gamma$  também apresentaram expressão diminuída de quimiocinas, como MCP-1 (figura 6C) e RANTES (figura 6D), em comparação aos seus respectivos controles obesos. Interessante notar que a expressão de IL-10, citocina considerada anti-inflamatória, também foi menor no grupo de camundongos obesos e deficientes em IFN- $\gamma$  em relação aos controles.

As proteínas da família *signal transducer and activation of transcription* (STAT) são capazes de regular a transcrição na inflamação e defesa imunológica. STAT-1, em particular, medeia os efeitos dos IFNs. Como esperado, nossos experimentos de perfil transcricional revelaram expressão aumentada desse fator de transcrição em adipócitos estimulados por IFN- $\gamma$  (dados não mostrados). O tecido adiposo de camundongos controles obesos também apresentou níveis aumentados de mRNA de STAT-1 em relação aos controles não-obesos. Por outro lado, os camundongos obesos e deficientes em IFN- $\gamma$  não mostraram expressão aumentada de STAT-1 (figura 6F).

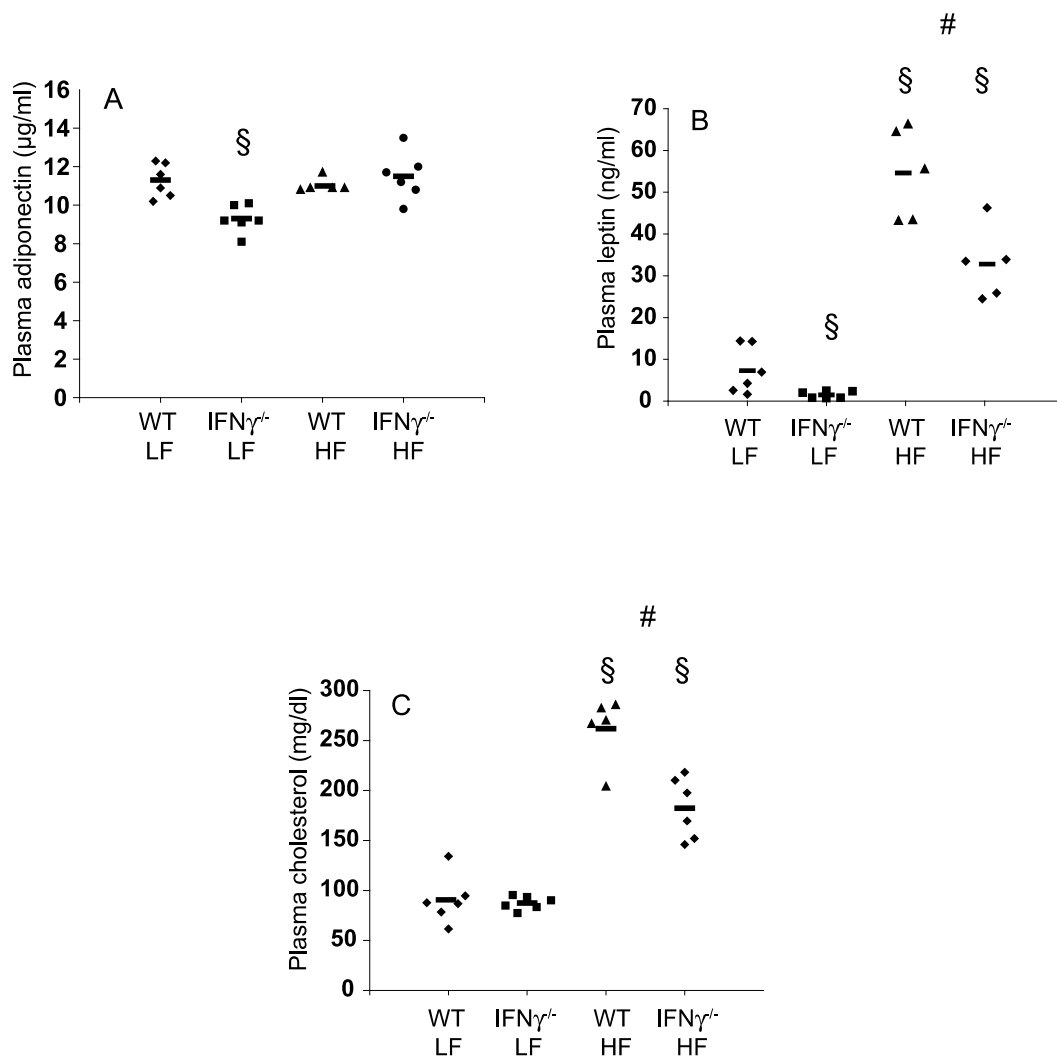


**Figura 6. IFN- $\gamma$  regula a expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo de camundongos obesos.** Níveis de mRNA de TNF- $\alpha$ , CD68, MCP-1, RANTES, IL-10, e STAT-1 (A-F, respectivamente) no tecido adiposo periepídídimo foram quantificados por RT-qPCR e normalizados para GAPDH. As barras representam níveis relativos de mRNA em relação ao grupo WT/LF. WT/LF, controles não-obesos; IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/LF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  não-obesos; WT/HF, controles obesos; IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/HF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  obesos. \*  $p < 0,01$  vs WT/LF; #  $p < 0,05$  vs WT/LF; §  $p < 0,05$  (n=5-6).

#### 4.5 A deficiência de IFN- $\gamma$ altera os níveis de leptina e colesterol total

Os camundongos apresentaram níveis plasmáticos similares de adiponectina, com exceção dos animais não-obesos com deficiência de IFN- $\gamma$  (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>/LF), que apresentaram níveis mais baixos de adiponectina que os demais grupos (figura 7A). Os camundongos obesos apresentaram níveis de leptina significativamente mais altos do que os não-obesos. Além disso, os camundongos deficientes em IFN- $\gamma$ , obesos e não-obesos, apresentaram níveis plasmáticos de leptina mais baixos do que seus respectivos controles (figura 7B). Ambos os grupos obesos apresentaram níveis de colesterol plasmático mais altos do que os grupos não-obesos. Embora camundongos não-obesos, controles e deficientes em IFN- $\gamma$ , tenham apresentado níveis similares de colesterol total, os camundongos obesos deficientes em IFN- $\gamma$  revelaram níveis mais baixos de colesterol do que os seus controles obesos (figura 7C).



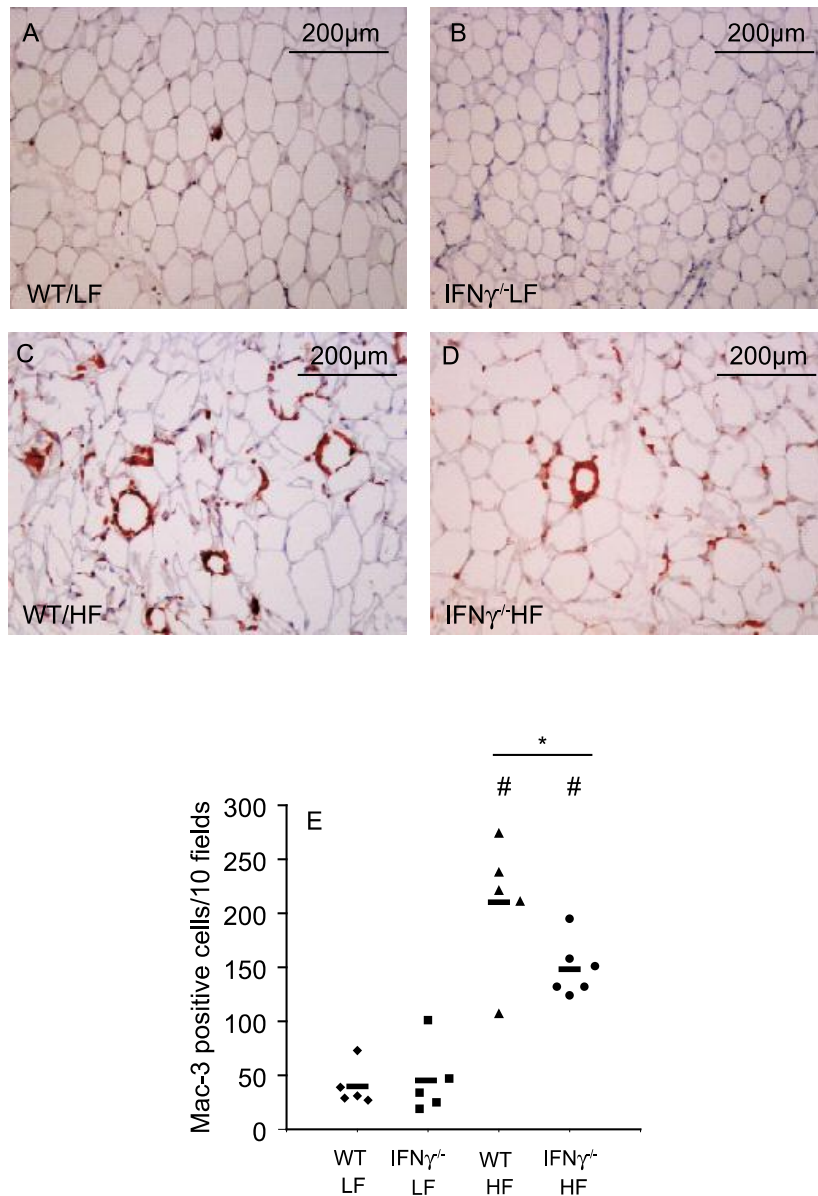


**Figura 7. Níveis plasmáticos de adiponectina, leptina, e colesterol total.** Valores representando os animais individualmente e a média em cada grupo foram plotados para cada medida. WT/LF, controles não-obesos; IFN $\gamma^{-/-}$ /LF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  não-obesos; WT/HF, controles obesos; IFN $\gamma^{-/-}$ /HF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  obesos. § $p$ <0.05 relative to WT/LF; # $p$ <0.05;  $n$ =5-6 em cada grupo.

#### 4.6 A deficiência de IFN- $\gamma$ reduz o acúmulo de células inflamatórias no tecido adiposo

O acúmulo de macrófagos é indicador importante de inflamação no tecido adiposo. Assim, buscamos evidência *in vivo* para um impacto funcional do IFN- $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo, avaliando o conteúdo de macrófagos nesse tecido em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  e controles. Camundongos não-obesos, tanto controles (WT/LF) como deficientes em IFN- $\gamma$  (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>/LF), apresentaram números similarmente baixos de células positivas para Mac-3 (representando macrófagos) em seu tecido adiposo (figura 8A e 8B). Camundongos obesos, como demonstrado anteriormente, apresentaram mais macrófagos em seu tecido adiposo quando comparados aos animais não-obesos (figura 8). No entanto, o tecido adiposo do grupo obeso deficiente em IFN- $\gamma$  (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>/HF) revelou um número menor de macrófagos do que os controles obesos (WT/HF) (figura 8C e 8D).

Geralmente, as células inflamatórias no tecido adiposo de camundongos obesos assumem distribuição semelhante a uma “coroa”, ao redor dos adipócitos. O tecido adiposo dos camundongos obesos deficientes em IFN- $\gamma$  revelou não apenas menos macrófagos individualmente, mas também menos “coroas” do que o tecido adiposo de controles obesos (Anexo C).



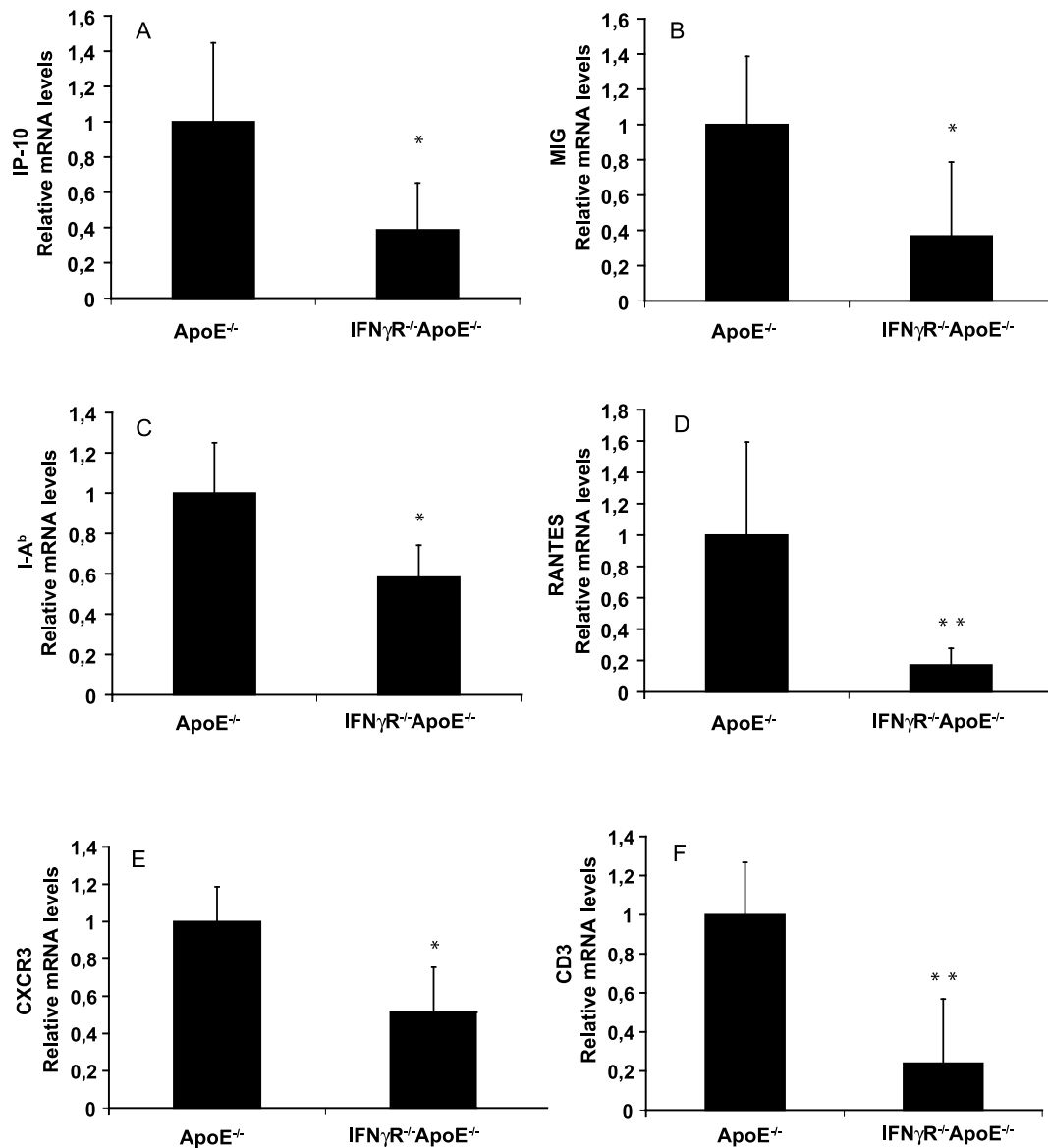
**Figura 8. A deficiência de IFN $\gamma$  limita o acúmulo de células inflamatórias em tecido adiposo visceral.** O tecido adiposo fixado e embocado em parafina foi incubado com anticorpos anti-Mac-3, e células positivas foram quantificadas em 10 campos consecutivos em cada slide. Uma figura representativa de cada grupo é mostrada (A-D). Números de cada grupo foram plotados em E, e as comparações entre as médias foram realizadas através do *Student's t test*; IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/LF, camundongos deficientes em IFN $\gamma$  não-obesos; WT/HF, controles obesos; IFN $\gamma$ <sup>-</sup>/HF, camundongos deficientes em IFN $\gamma$  obesos. # p < 0,05 vs WT/LF; \* p < 0,05 (n=5 a 6).

#### **4.7 A deficiência do receptor de IFN- $\gamma$ regula a inflamação no tecido adiposo visceral e afeta os metabolismos lipídico e glicêmico em camundongos obesos ApoE<sup>-/-</sup>**

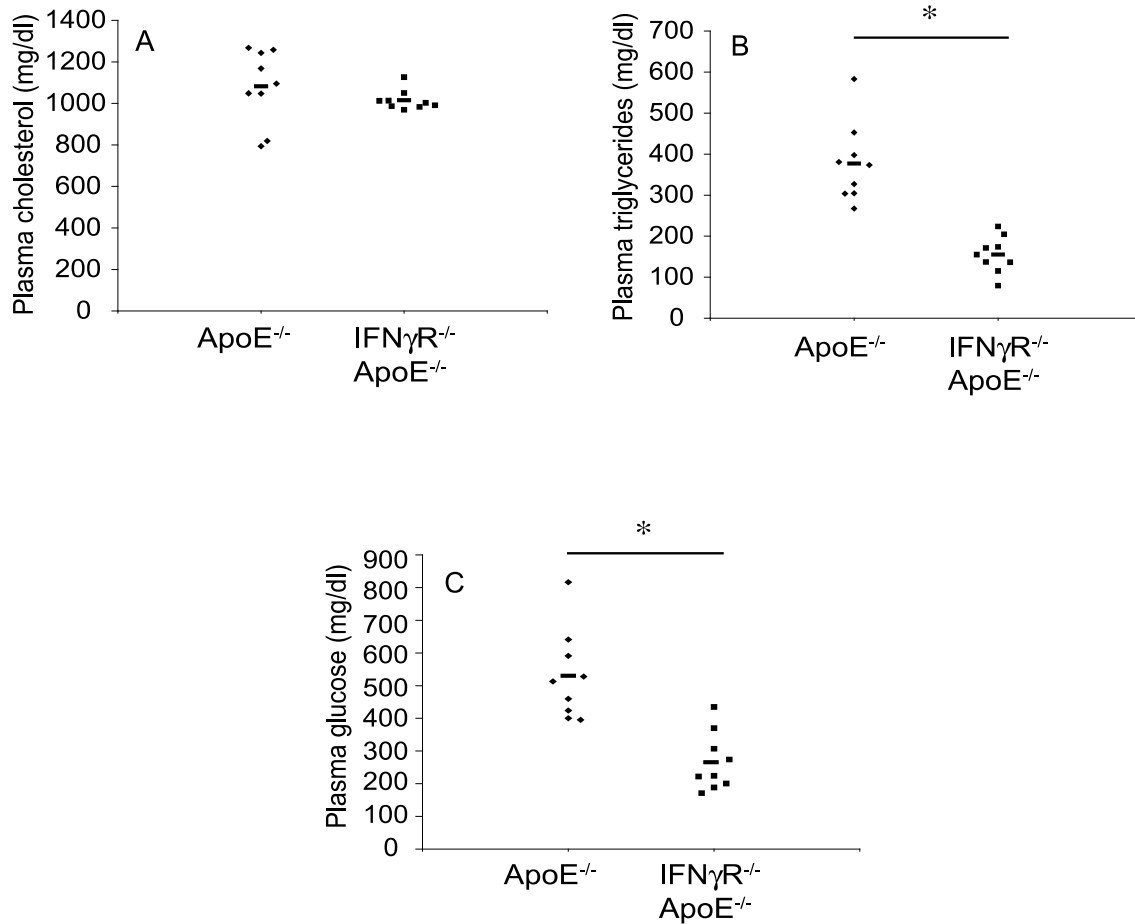
Existe evidência abundante associando inflamação e aterosclerose. Os achados prévios favorecendo um papel do IFN- $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo em animais C57BL/6 estimularam exploração adicional dos efeitos da sinalização defeituosa pelo IFN- $\gamma$  no tecido adiposo de camundongos suscetíveis a aterosclerose, como os camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>). Outros autores analisaram as lesões ateroscleróticas em camundongos com sinalização defeituosa pelo IFN- $\gamma$ <sup>(59)</sup>.

Camundongos com deficiência dupla do receptor de IFN- $\gamma$  e de ApoE (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>) e seus respectivos controles ApoE<sup>-/-</sup> receberam dieta rica em gordura. Após 2 meses, o tecido adiposo visceral dos camundongos IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> apresentaram níveis mais baixos de mRNA de vários genes inflamatórios em comparação aos controles ApoE<sup>-/-</sup> (figura 9), a despeito de seus pesos corporais semelhantes (dados não mostrados). O tecido adiposo desses animais revelou níveis reduzidos de mRNA de IP-10, MIG, I-A<sup>b</sup>, RANTES, e CXCR3 (figura 9A a 9E), cada um codificando um mediador com papel reconhecidamente importante na resposta imune adaptativa, seja no tráfego de células T (IP-10, MIG, RANTES, e CXCR3), seja na apresentação de antígenos (I-A<sup>b</sup>). A expressão também diminuída de CD3 (figura 9F) se mostrou em concordância com esses achados, indicando um conteúdo reduzido de células T no tecido adiposo de animais com dupla deficiência IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> em relação aos controles ApoE<sup>-/-</sup>. Níveis de mRNA de MCP-1,

CD68, e TNF- $\alpha$ , por outro lado, não se mostraram reduzidos no tecido adiposo dos animais com dupla deficiência comparados aos respectivos controles (dados não mostrados), em contraste à expressão reduzida do mRNA desses mesmos genes em camundongos obesos deficientes em IFN- $\gamma$  não-ateroscleróticos, como descrito em seção anterior desse manuscrito. A ausência de sinalização pelo IFN- $\gamma$  através da deleção do receptor dessa citocina em camundongos obesos ApoE<sup>-/-</sup> também afetou os metabolismos lipídico e glicêmico. Embora os dois grupos tenham apresentado níveis similares de colesterol total (figura 10A), os animais com dupla deficiência apresentaram triglicérides plasmáticos e glicemia significativamente reduzidos em relação aos controles ApoE<sup>-/-</sup> (figuras 10B e 10C).



**Figura 9.** A deficiência do receptor de IFN $\gamma$  regula a inflamação no tecido adiposo visceral de camundongos obesos *ApoE*<sup>-/-</sup>. Níveis de mRNA de IP-10, MIG, I-A<sup>b</sup>, RANTES, CXCR3, e CD3 (A-F) no tecido adiposo periepídídimo foram quantificados por RT-qPCR e normalizados para GAPDH. Níveis relativos de mRNA foram calculados em camundongos *IFN* $\gamma$ *R*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> em relação aos controles *ApoE*<sup>-/-</sup>. *ApoE*<sup>-/-</sup>, camundongos deficientes em apolipoproteína E; *IFN* $\gamma$ *R*<sup>-/-</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup>, camundongos deficientes em apolipoproteína E e no receptor de IFN $\gamma$ . \* p < 0,05 vs *ApoE*<sup>-/-</sup>; \*\* p < 0,01 vs *ApoE*<sup>-/-</sup> (n=5 a 8).



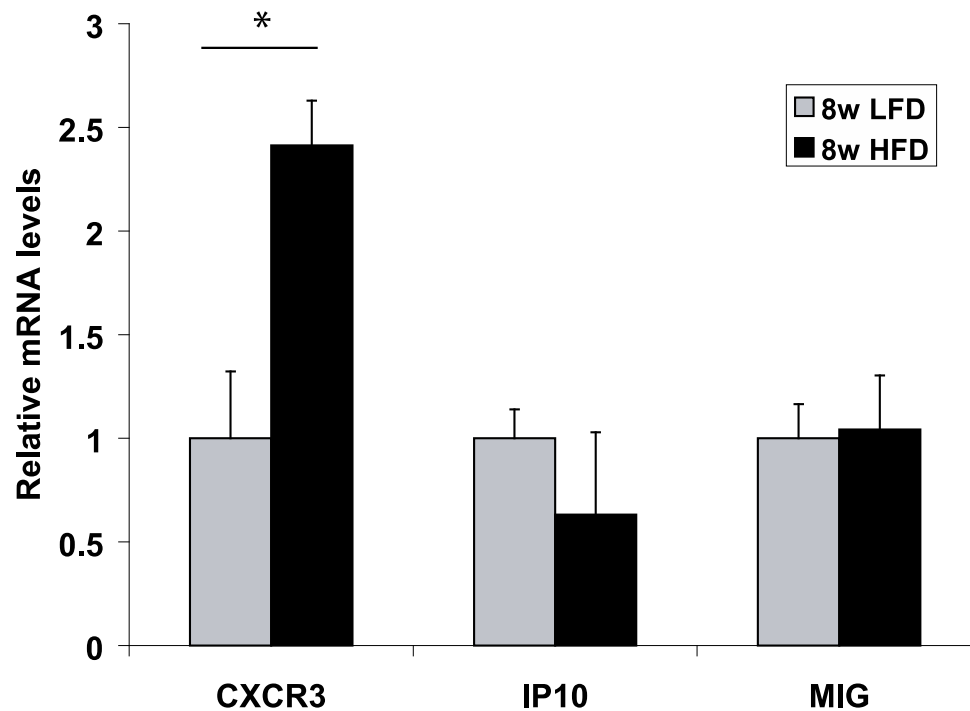
**Figura 10. Níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides e glicose em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> e IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>.** Valores representando os animais individualmente e a média de cada grupo foram plotados para cada medida. ApoE<sup>-/-</sup>, camundongos deficientes em apolipoproteína E; IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup>, camundongos deficientes em apolipoproteína E e no receptor de IFN $\gamma$ . \* $p < 0.01$  vs ApoE<sup>-/-</sup>;  $n = 9$  em cada grupo.

**Referentes ao objetivo 2: Avaliar a importância do receptor de quimiocinas CXCR3 no acúmulo de células T no tecido adiposo em camundongos obesos**

#### **4.8 Camundongos C57BL/6 obesos exibem maior expressão de CXCR3 no tecido adiposo visceral do que os não-obesos**

Células estromais vasculares isoladas de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 obesos apresentaram níveis significativamente mais elevados de mRNA de CXCR3 do que células estromais vasculares de controles não-obesos após 8 semanas de dieta rica (8w HFD) ou pobre (8w LFD) em gorduras, respectivamente (figura 11). Níveis de mRNA que codificam ligantes de CXCR3, como as quimiocinas IP-10 e MIG, não diferiram entre os grupos de camundongos obesos e não-obesos após o período de 8 semanas (figura 11).



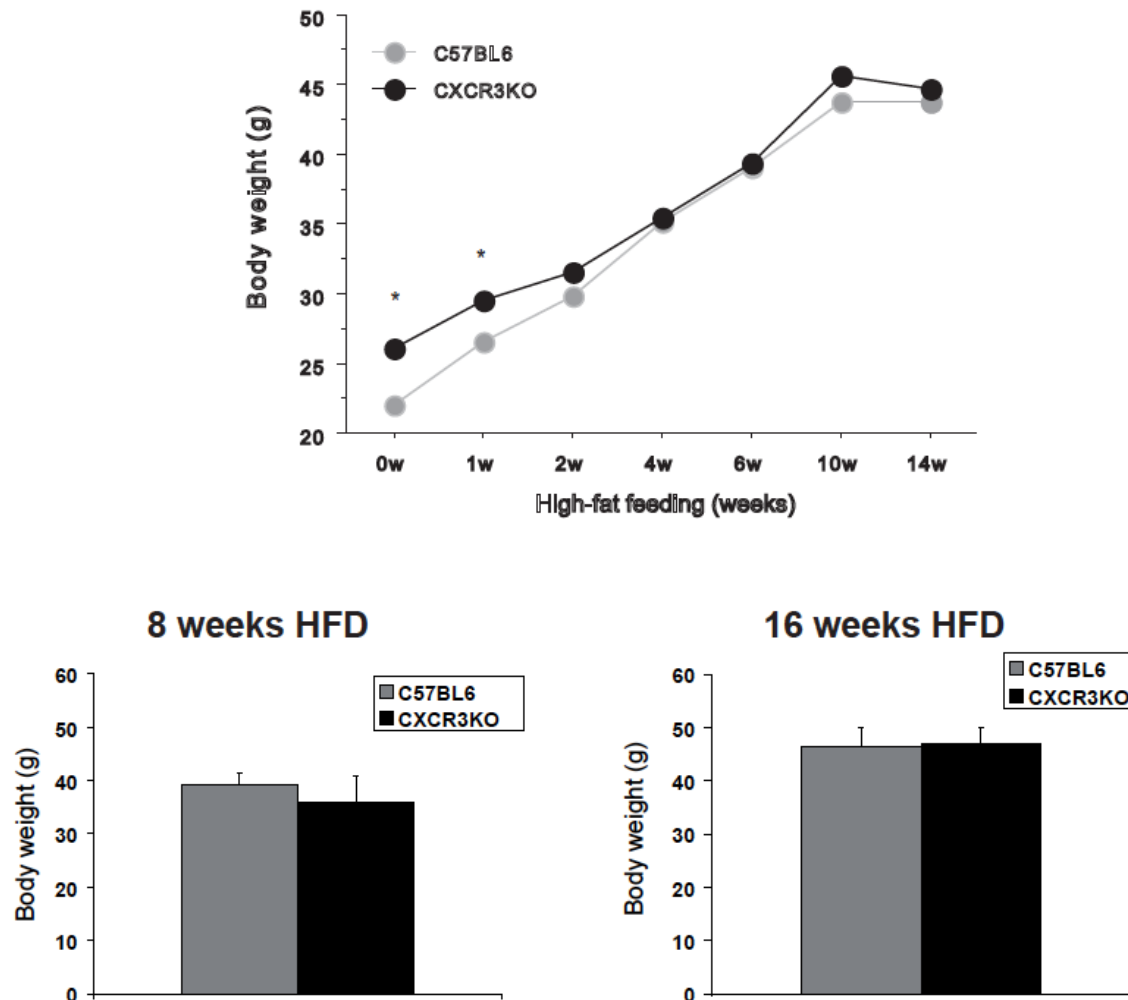


**Figura 11. Células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo visceral de camundongos obesos apresentam maior expressão de CXCR3 do que células de camundongos não-obesos.** RNA foi extraído de células estromais vasculares derivadas de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 não-obesos (que receberam dieta pobre em gordura – LFD) ou obesos (que receberam dieta rica em gordura – HFD). O gráfico representa níveis relativos de mRNA de CXCR3, IP-10, e MIG no tecido adiposo do grupo LFD (barras cinzas) e no grupo HFD (barras pretas) após 8 semanas de dieta, normalizados para a expressão de GAPDH. \*  $p < 0,05$  vs LFD (n=5/grupo).

#### **4.9 Camundongos obesos deficientes em CXCR3 acumulam menos células T em seu tecido adiposo visceral do que controles obesos**

Considerando-se a especificidade do CXCR3 para a migração de linfócitos T, procedemos então com a análise da importância desse receptor de quimiocinas para o acúmulo de células T no tecido adiposo de camundongos obesos. Com esse objetivo, utilizamos camundongos deficientes em CXCR3 e controles C57BL/6. Animais deficientes em CXCR3 e respectivos controles começaram a receber dieta rica em gorduras com a idade de 8 semanas. Com exceção da primeira semana de dieta rica em gorduras, não houve diferença no peso corporal entre os 2 grupos (figura 12).

Camundongos deficientes em CXCR3 e controles não apresentaram diferenças consistentes nos índices de VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, ou RER, antes ou 4 semanas após o início da dieta rica em gorduras (anexo D). O nível de atividade física foi mais baixo, e uma redução discreta, porém estatisticamente significativa, ocorreu no consumo alimentar entre os camundongos deficientes em CXCR3 em comparação aos controles sob dieta rica em gordura.

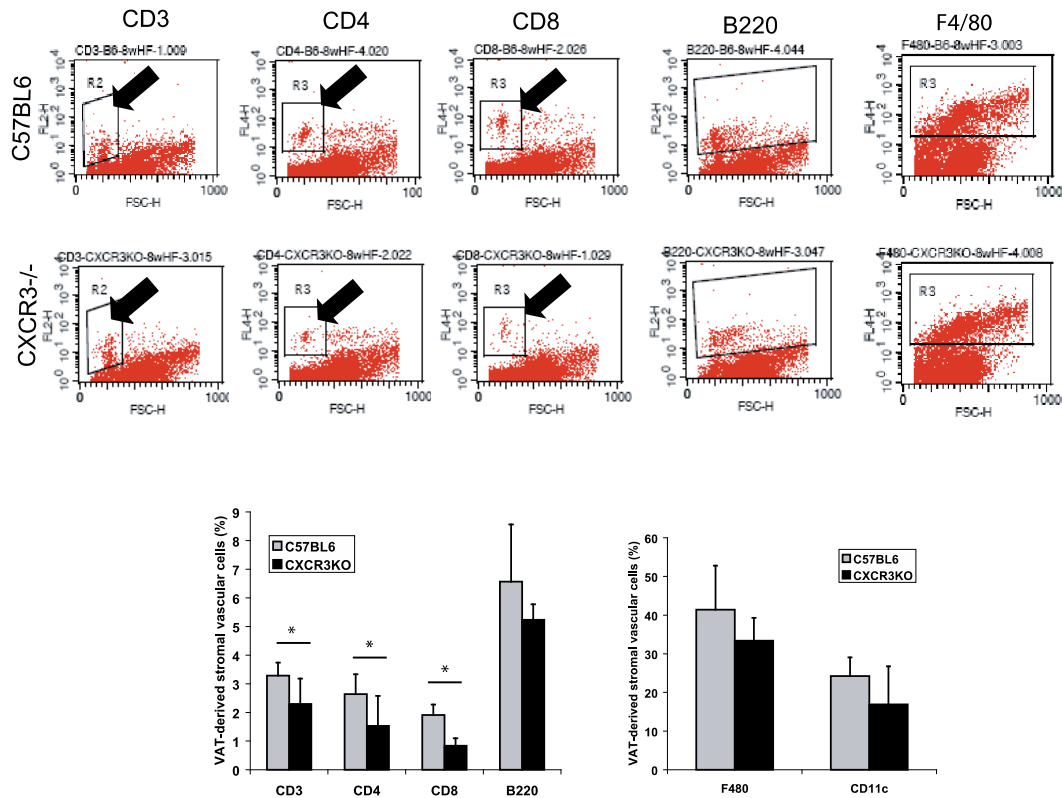


**Figura 12. Camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles apresentaram peso corporal similar após 8 e 16 semanas de dieta rica em gorduras (HFD).** Camundongos deficientes em CXCR3 e controles C57BL/6J consumiram dieta pobre em gorduras do desmame até 8 semanas de idade. A partir daí, consumiram dieta rica em gorduras até 8 ou 16 semanas adicionais. O peso corporal de cada animal foi medido em condição basal, e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, e 16 semanas após o início da dieta rica em gorduras. Os gráficos A e B representam o peso corporal médio dos camundongos deficientes em CXCR3 (barras pretas) e seus respectivos controles (barras cinzas) após 8 e 16 semanas de dieta rica em gorduras, respectivamente.

Após 8 semanas de dieta rica em gorduras, ambos os grupos de camundongos apresentaram pesos corporais médios similares (figura 12), porém pesos de gordura periepididimal diferentes (não mostrado). Animais obesos deficientes em CXCR3 apresentaram menos linfócitos CD3<sup>+</sup> em seu tecido adiposo visceral em comparação aos controles obesos (figura 13) ( $2.3 \pm 0.9$  vs  $3.3 \pm 0.5$ ;  $p < 0.01$ ), de acordo com experimentos de citometria de fluxo. Subpopulações de células T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, também se mostraram reduzidas no tecido adiposo de camundongos obesos deficientes em CXCR3, em comparação aos seus respectivos controles (CD4<sup>+</sup>:  $1.5 \pm 1$  vs  $2.6 \pm 0.7$ ;  $p < 0.02$ ; CD8<sup>+</sup>:  $0.8 \pm 0.3$  vs  $1.9 \pm 0.4$ ;  $p < 0.001$ ) (figura 13).

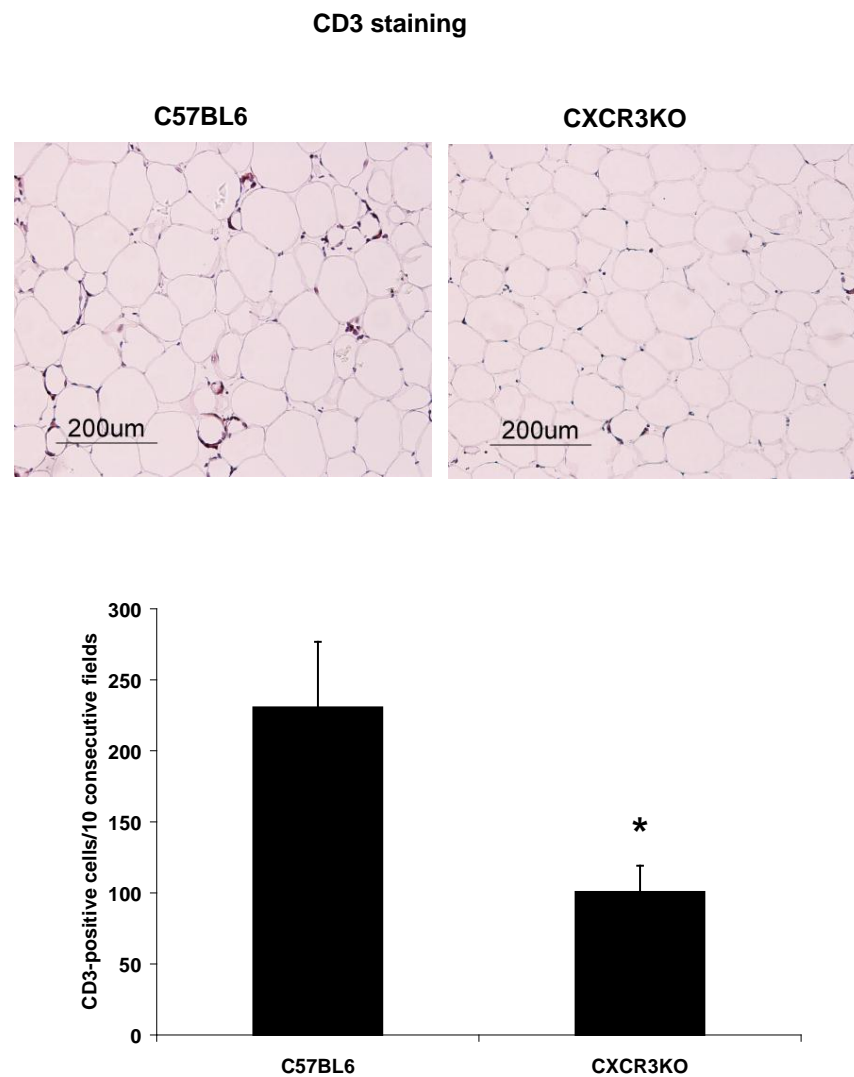
As proporções de células B (B220<sup>+</sup>), macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), e células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) não diferiram entre os grupos (figura 13).

## 8 week-HFD



**Figura 13.** O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 apresenta menos células T do que controles obesos após 8 semanas de dieta rica em gordura, por citometria de fluxo. Células estromais vasculares provenientes de 1 g de tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 e de controles alimentados com dieta rica em gordura por 8 semanas foram marcadas com anticorpos conjugados com CD3, CD4, CD8, B220, F4/80, e CD11c, e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam porcentagens de células marcadas para cada um desses anticorpos (e contidas dentro de “janelas” pré-determinadas ou *gates*, representadas pelas setas) em ambos os grupos de animais: deficientes em CXCR3 (barras pretas) e controles (barras cinzas). Os dados são mostrados como média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,02$ ;  $n = 9$ /grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3; VAT, tecido adiposo visceral.

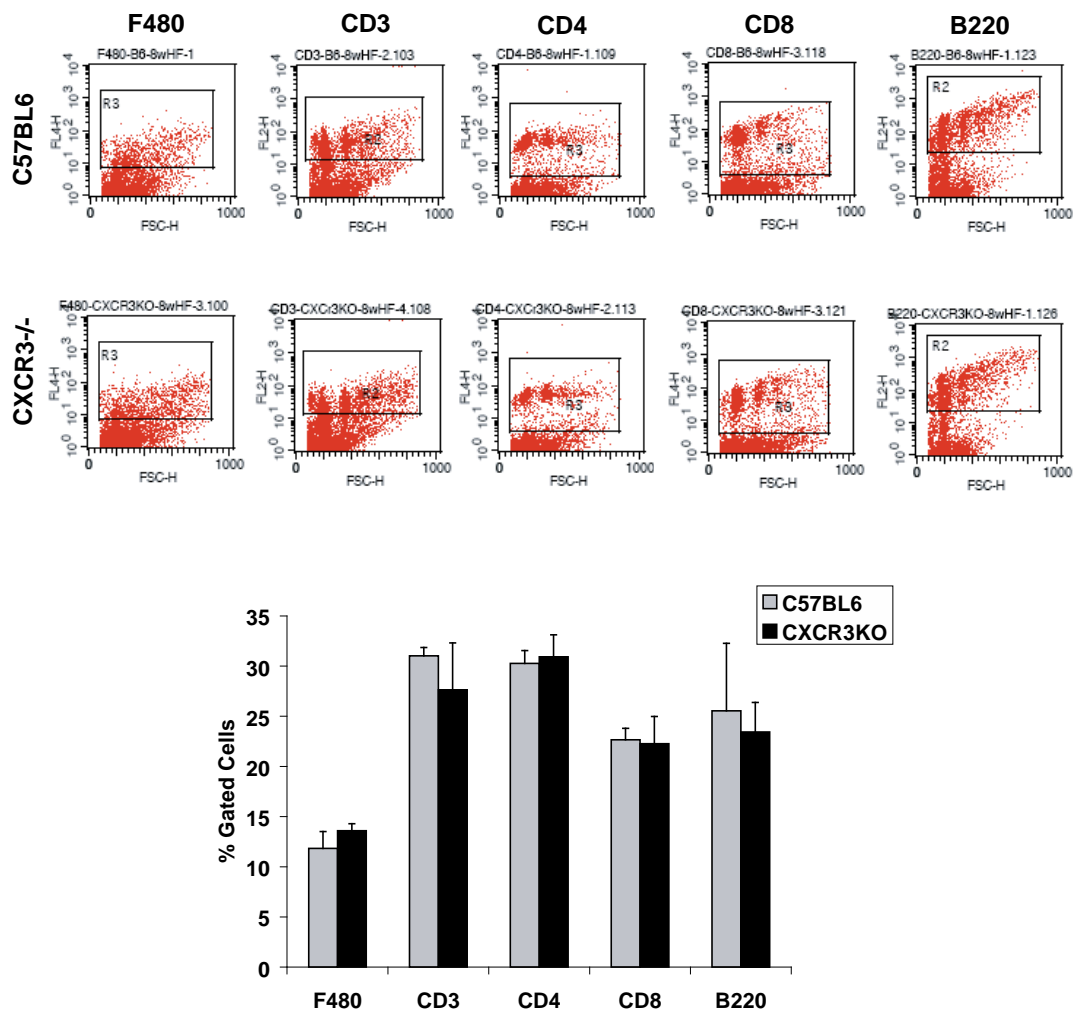
Em concordância com os resultados de citometria de fluxo, a análise quantitativa por imunohistoquímica também mostrou um menor número de células T CD3<sup>+</sup> no tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 em comparação aos controles (figura 14).



\*  $p < 0,01$ ;  $n = 3-4$ /grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3.

**Figura 14. O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 apresentou menos células T do que controles obesos, por imunohistoquímica.** Secções de tecido adiposo periepídídimo de camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles foram incubadas com anticorpos anti-CD3, como descrito no texto (fotos representativas são mostradas). Células positivas foram contadas sob um microscópio em 10 campos consecutivos. Os dados são mostrados como média  $\pm$  SD.

O hemograma não revelou qualquer diferença em subpopulações celulares de sangue periférico entre os dois grupos de camundongos, deficientes em CXCR3 e controles (dados não mostrados). Além disso, ambos os grupos de camundongos apresentaram proporções similares de células esplênicas expressando F4/80, CD3, CD4, CD8, e B220 (figura 15).

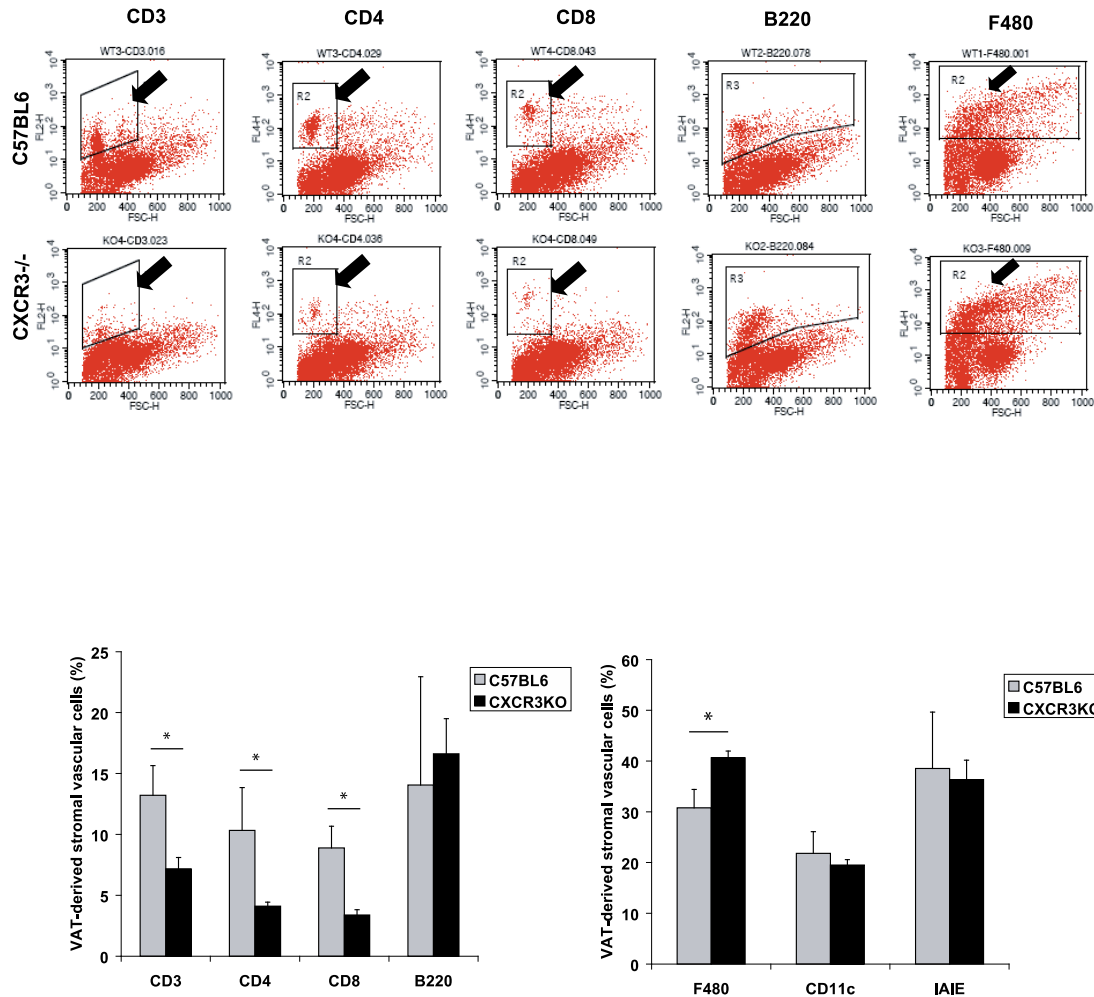


**Figura 15.** Os baços de camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles apresentaram proporções similares de macrófagos e linfócitos. Esplenócitos de camundongos deficientes em CXCR3 e controles que receberam dieta rica em gordura foram marcados com anticorpos conjugados com F4/80, CD3, CD4, CD8, e B220, e foram analisados por citometria de fluxo. Os gráficos representam as porcentagens de células marcadas (e contidas em *gates*) em ambos os grupos de camundongos, deficientes em CXCR3 (barras pretas) e controles (barras cinzas). Médias foram comparadas através do *Student t test*. \* $p < 0,05$ . CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3.

Após 16 semanas de dieta rica em gorduras, ambos os grupos de camundongos apresentaram médias de peso corporal (figura 12), assim como de peso de gordura periepídídima similares (dados não mostrados). Similarmente ao grupo de 8 semanas, o tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 que receberam dieta gordurosa por 16 semanas apresentou significativamente menos células T CD3<sup>+</sup> ( $7 \pm 0.9$  vs  $13 \pm 2.4$ ;  $p < 0.01$ ), incluindo ambas as subpopulações — CD4<sup>+</sup> ( $4 \pm 0.3$  vs  $10 \pm 3.5$ ;  $p < 0.02$ ) e CD8<sup>+</sup> ( $3.4 \pm 0.4$  vs  $8.9 \pm 1.8$ ;  $p < 0.001$ ) – em comparação aos controles sob a mesma dieta (figura 16). O tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 também exibiu menor número de células CD25<sup>+</sup>, representando tanto células T efetoras como células T regulatórias (Tregs), em comparação a camundongos controles ( $3.5 \pm 0.44$  vs  $4.4 \pm 0.58$ ;  $P = 0.02$ ). Diferentemente do observado com 8 semanas, o tecido adiposo dos camundongos deficientes em CXCR3 que receberam dieta gordurosa por 16 semanas apresentou mais macrófagos positivos para F4/80<sup>+</sup> em relação aos respectivos controles (figura 16). A proporção de células positivas para CD11c e MHCII não foi diferente entre os 2 grupos.



## 16 week-HFD

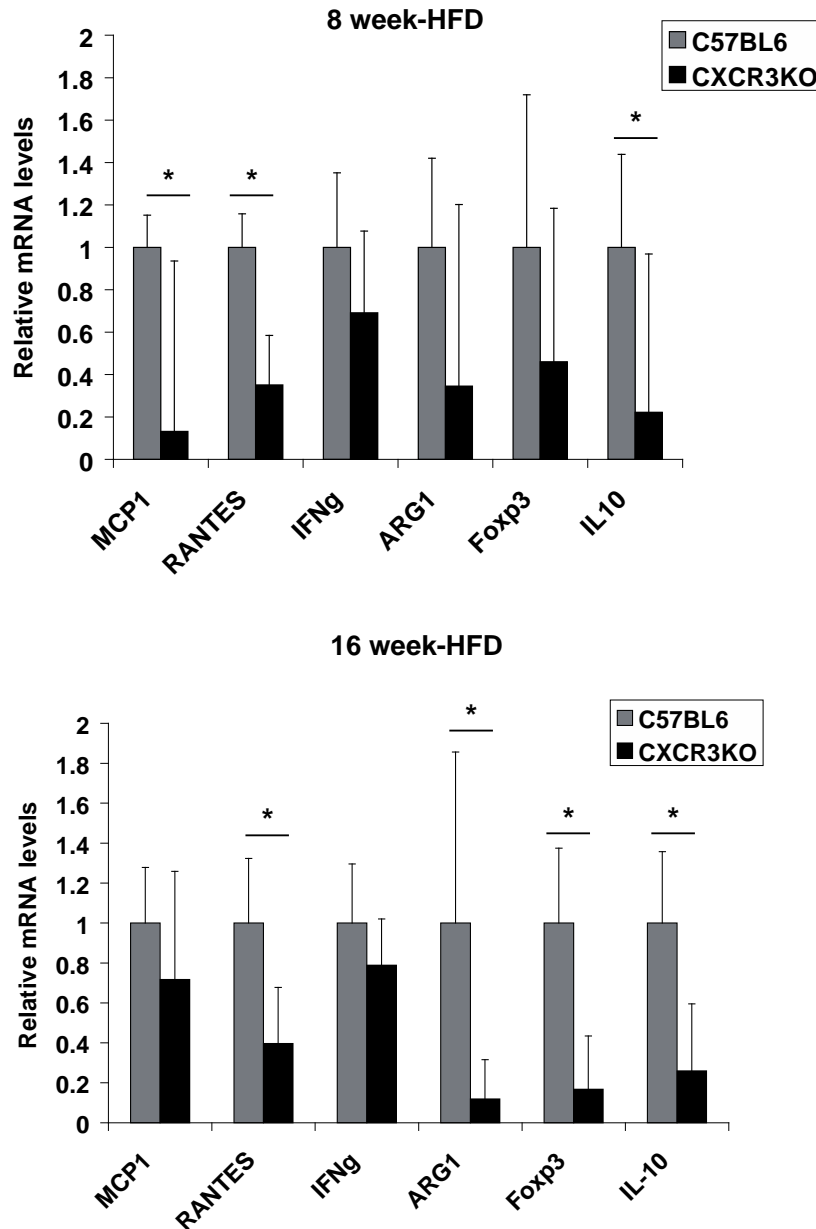


**Figura 16.** O tecido adiposo visceral de camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibiu menos células T do que controles obesos após 16 semanas de dieta rica em gordura, por citometria de fluxo. Células estromais vasculares provenientes de 1 g de tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 e de controles que receberam dieta rica em gordura por 16 semanas foram marcadas com anticorpos conjugados com CD3, CD4, CD8, B220, CD25, F4/80, CD11c, e IAIE, e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam porcentagens de células marcadas (e contidas em *gates*) em ambos os grupos de animais: deficientes em CXCR3 (barras pretas) e controles (barras cinzas). Os dados são mostrados como média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,02$ ;  $n = 5-6$ /grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3; VAT, tecido adiposo visceral.

#### **4.10 Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem expressão reduzida de genes inflamatórios em seu tecido adiposo em comparação a controles obesos**

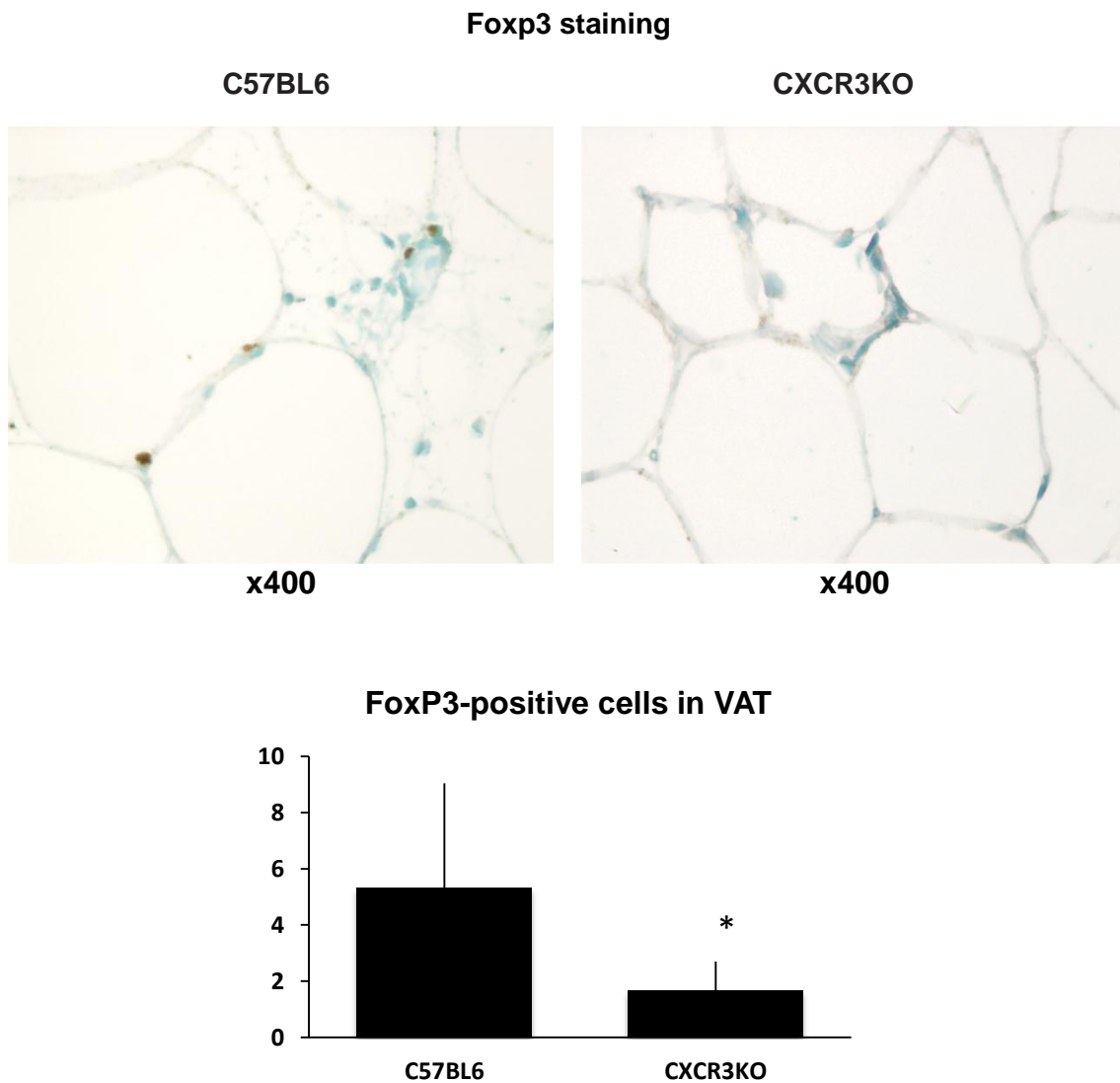
A deficiência de CXCR3 resultou em expressão diminuída de diversos genes relacionados a inflamação. Após 8 semanas de dieta rica em gorduras, camundongos deficientes em CXCR3 apresentaram menor expressão de mRNA de quimiocinas, como MCP-1 e RANTES em seu tecido adiposo visceral, em comparação a seus respectivos controles (figura 17). Também comparados aos controles, animais com deficiência em CXCR3 exibiram menores níveis de mRNA de interleucina-10 (IL-10) (figura 17), citocina com funções anti-inflamatórias. Tregs e macrófagos M2 podem elaborar IL-10 em diversas condições inflamatórias, e parecem exercer efeito metabólico protetor na obesidade. Esse achado nos estimulou então a medir os níveis de mRNA do marcador de célula T regulatória Foxp3 (um fator de transcrição da família *forkhead*) e arginase 1, um dos produtos prototípicos dos macrófagos M2 em camundongos. A expressão desses marcadores não variou significativamente entre deficientes em CXCR3 e respectivos controles após 8 semanas de dieta gordurosa (figura 17). No entanto, após 16 semanas de dieta rica em gordura, os camundongos deficientes em CXCR3 apresentaram em seu tecido adiposo visceral expressão de mRNA de IL-10, Foxp3, e arginase 1 significativamente reduzida em relação aos controles (figura 17). A expressão de IFN- $\gamma$  revelou tendência à redução entre camundongos deficientes em CXCR3 após 8 e 16 semanas de dieta gordurosa, mas as diferenças não atingiram significância estatística (figura 17). Os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIG, e MHC II

também não foram diferentes entre os grupos em nenhum dos períodos de dieta (não mostrado).



**Figura 17. Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem expressão reduzida de genes relacionados a inflamação em seu tecido adiposo visceral, em comparação a controles obesos.** Níveis de mRNA de MCP-1, RANTES, IFN- $\gamma$ , ARG1, Foxp3, e IL-10 no tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 (barras pretas) e controles (barras cinzas) após 8 semanas (A) e 16 semanas de dieta gordurosa (B) foram quantificados por RT-qPCR e normalizados pela expressão de GAPDH. Níveis relativos de mRNA em camundongos deficientes em CXCR3 foram calculados em relação aos controles. \*  $p < 0,05$  vs controles;  $n = 6$ / grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3.

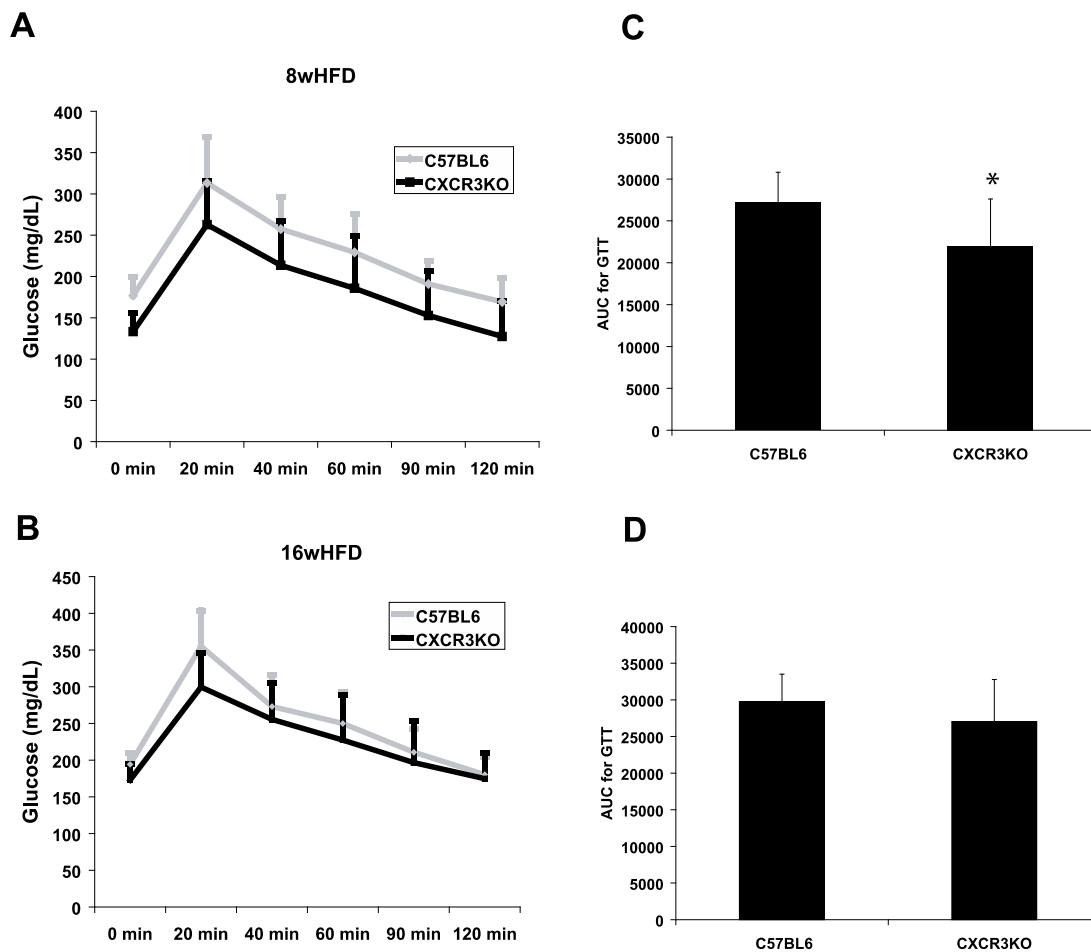
Em concordância com a expressão reduzida de mRNA de Foxp3 no tecido adiposo visceral de camundongos deficientes em CXCR3 em comparação aos controles após 16 semanas de dieta rica em gorduras, a análise por imunohistoquímica também mostrou número significativamente menor de células positivas para Foxp3, ou seja, células T regulatórias, no tecido adiposo daqueles animais (figura 18).



**Figura 18.** O tecido adiposo visceral de camundongos deficientes em CXCR3 apresentou menos células Foxp3-positivas do que o tecido adiposo de seus controles, por imunohistoquímica. Secções de tecido adiposo periepididimal de camundongos deficientes em CXCR3 e controles foram incubados com anticorpos anti-Foxp3, como descrito no texto (fotos representativas são mostradas). Células positivas foram contadas sob um microscópio. Dados são apresentados como média  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 6-9$ /grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3, VAT, tecido adiposo visceral.

#### **4.11 Camundongos obesos deficientes em CXCR3 exibem maior tolerância à glicose e níveis plasmáticos de leptina e colesterol total mais baixos em comparação a controles obesos**

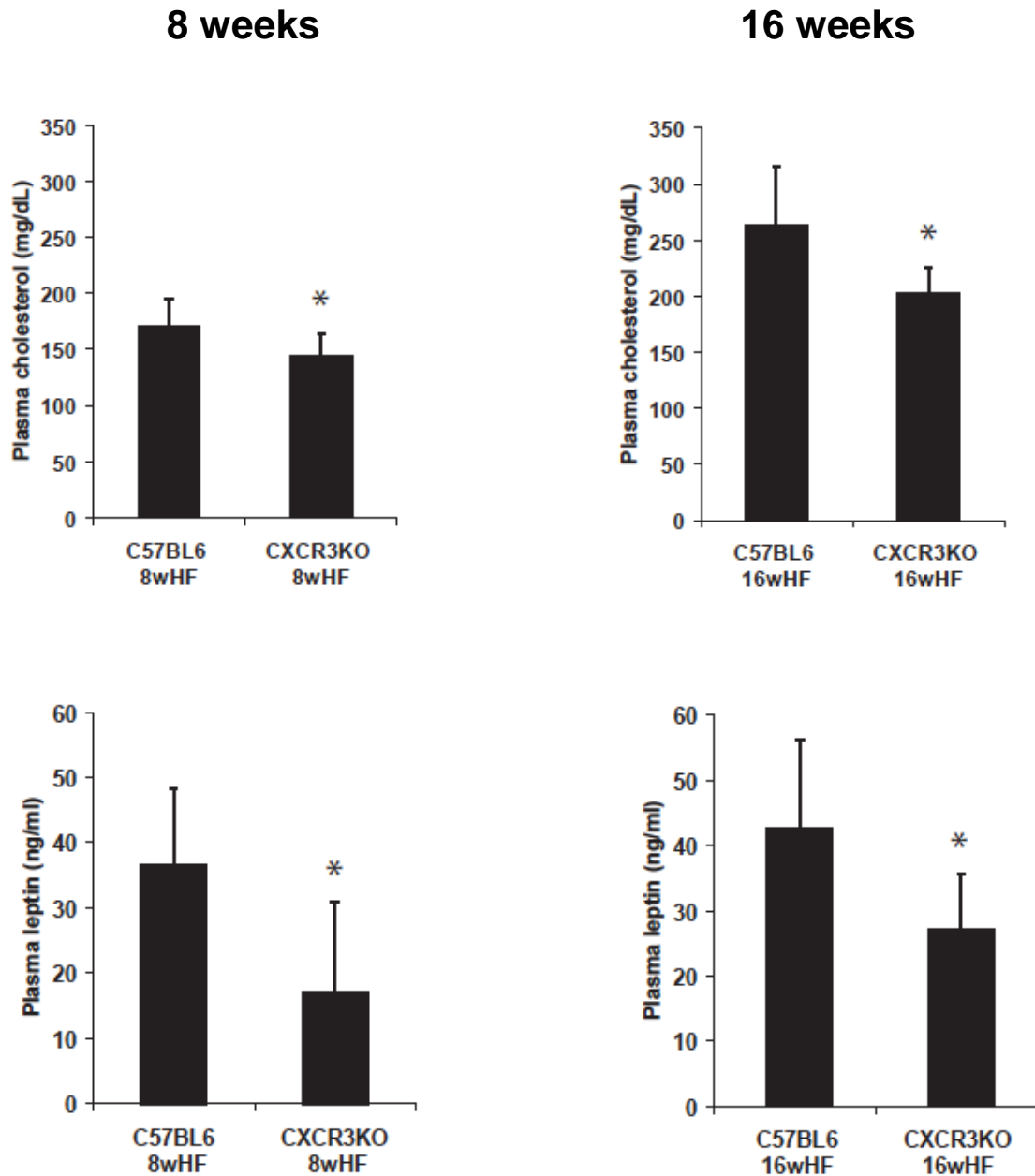
Camundongos deficientes em CXCR3 apresentaram maior tolerância à glicose em resposta à injeção de glicose intraperitoneal em comparação aos controles após 8 semanas de dieta gordurosa, a despeito de exibirem pesos corporais semelhantes (figuras 19A e 19C). Animais que consumiram dieta gordurosa por 16 semanas apresentaram tendência similar, mas a diferença entre as curvas glicêmicas não atingiu significância estatística (figuras 19B e 19D).



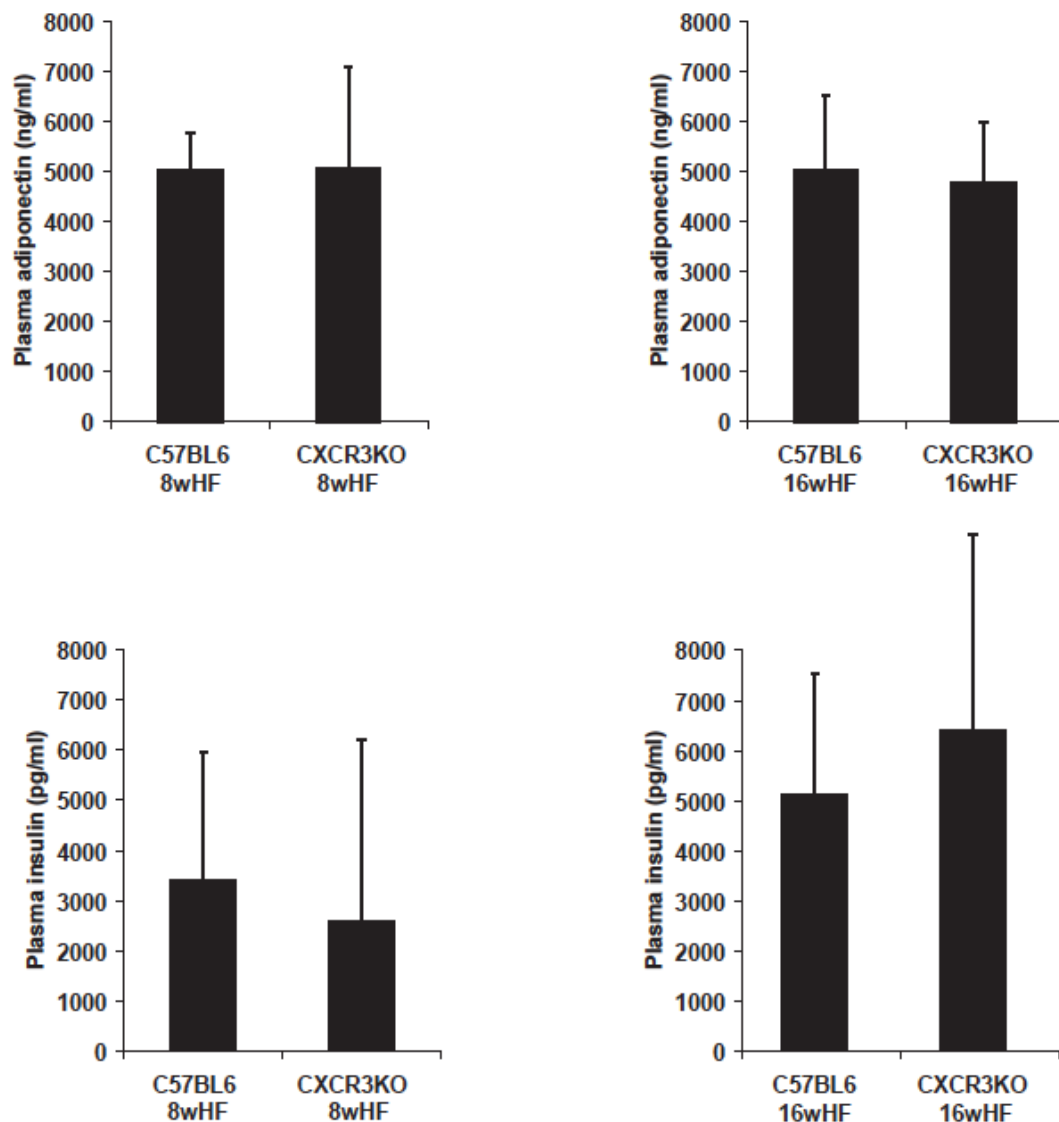
**Figura 19. Camundongos deficientes em CXCR3 apresentam maior tolerância à glicose do que seus respectivos controles.** Curvas médias de tolerância à glicose de camundongos deficientes em CXCR3 (curvas pretas) e controles (curvas cinzas) após 8 (8wHFD) e 16 semanas (16wHFD) de dieta gordurosa são apresentadas em A e B, respectivamente. As áreas sob as curvas (AUC) de tolerância à glicose foram calculadas para cada animal, e a média de cada grupo está representada em C e D. Dados são mostrados como média  $\pm$  SD. \*  $p \leq 0,01$ ;  $n=19-22$  grupo. CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3.

Os camundongos deficientes em CXCR3 apresentaram concentrações plasmáticas mais baixas de leptina do que os controles após 8 e 16 semanas de dieta gordurosa (figura 20). De forma semelhante, os níveis plasmáticos de colesterol total, que aumentaram ao longo do tempo em ambos os grupos,

também se mostraram mais baixos nos deficientes em CXCR3 comparados aos controles (figura 20). As concentrações plasmáticas de adiponectina e insulina não foram significativamente diferentes entre os grupos em nenhum dos períodos (figura 20).







**Figura 20.** Camundongos obesos com deficiência de CXCR3 exibem níveis plasmáticos reduzidos de leptina e colesterol total, comparados com controles obesos. Concentrações plasmáticas de colesterol, leptina, adiponectina, e insulina foram medidas em sangue heparinizado coletado no dia do sacrifício de camundongos deficientes em CXCR3 e controles sob dieta rica em gordura por 8 ou 16 semanas. Médias foram comparadas através do *Student t test*. \* $p < 0,05$ . CXCR3KO, camundongos deficientes em CXCR3.

## **5 Discussão**

---

Nossos resultados demonstraram um importante papel da imunidade adaptativa na rede inflamatória do tecido adiposo em animais obesos, mais especificamente da citocina Th1 IFN- $\gamma$ . Em concordância com estudo prévio<sup>(65)</sup>, nosso estudo demonstrou que as células T, incluindo ambas as subpopulações CD4 e CD8, estão presentes em maior número no tecido adiposo de camundongos obesos em comparação a controles não-obesos. Experimentos de imunolocalização revelaram a distribuição das células T geralmente em grupos com outros linfócitos e macrófagos, formando estruturas semelhantes a “coroas” ao redor de adipócitos.

A imunohistoquímica também revelou aumento do número de células expressando I-A<sup>b</sup> (que representa o MHC II de camundongos) no tecido adiposo visceral de camundongos obesos em comparação aos não-obesos. A magnitude da expressão do MHC II na superfície de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas e macrófagos, em geral se correlaciona com a ativação das células T. De fato, células apresentadoras de antígenos podem ativar as células T através da interação entre o seu MHC II e o receptor de célula T, como mencionado anteriormente. Assim, o aumento na expressão de I-A<sup>b</sup> no tecido adiposo visceral de camundongos obesos pode sugerir tanto a ativação local das células T, como também a atuação do IFN- $\gamma$ , conhecido regulador da expressão de I-A<sup>b</sup>.

Macrófagos e células dendríticas no tecido adiposo vem recebendo atenção considerável recentemente<sup>(35, 36, 41)</sup>. Por outro lado, a participação das células T e suas citocinas na obesidade e suas consequências metabólicas

permanecia pouco explorada até então. A predominância de citocinas Th1 sobre as citocinas Th2 em outras condições inflamatórias crônicas como a aterosclerose<sup>(75)</sup> direcionou nossa atenção para o IFN- $\gamma$ , clássica citocina Th1. De fato, nossos resultados mostraram aumento da expressão de mRNA do IFN- $\gamma$  no tecido adiposo de camundongos obesos após 21 semanas de dieta rica em gordura em comparação a camundongos não-obesos. Além disso, células T isoladas do tecido adiposo de camundongos obesos e estimuladas *in vitro* produziram maior quantidade de IFN- $\gamma$  do que aquelas células isoladas de camundongos não-obesos. Esses resultados sugerem que a obesidade pode ativar células T do tecido adiposo em direção ao polo Th1.

Na aterogênese, o IFN- $\gamma$  participa da progressão da placa aterosclerótica, influenciando de forma importante todos os tipos celulares locais: células endoteliais, células musculares lisas, e macrófagos<sup>(75)</sup>. Nossos resultados sugerem papel relevante do IFN- $\gamma$  também no tecido adiposo em expansão, em que adipócitos respondem a produtos inflamatórios derivados de macrófagos infiltrantes, como por exemplo, TNF- $\alpha$ <sup>(76)</sup>. De fato, quando estimuladas por IFN- $\gamma$ , células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos maduros secretaram diversos mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas de células T como IP-10 e MIG. Tais achados sugerem o potencial de uma alça de *feedback* positivo, em que as células T presentes no tecido adiposo produzem IFN- $\gamma$ , que pode atuar sobre os adipócitos (e possivelmente sobre outras células locais como os próprios macrófagos), os quais por sua vez secretam quimiocinas, que podem amplificar o recrutamento local de células T e o processo inflamatório na obesidade (figura 21). Dessa forma, embora menos numerosas do que os macrófagos, as células T podem influenciar

decisivamente a biologia do tecido adiposo na obesidade através das citocinas que produzem.

O perfil de transcrição dos adipócitos estimulados por IFN- $\gamma$  permitiu visão ainda mais ampla das ações dessa citocina sobre os adipócitos. Além dos mediadores quimiotáticos mencionados acima, a estimulação dos adipócitos com IFN- $\gamma$  aumentou a expressão de uma gama de outras quimiocinas e receptores de quimiocinas conhecidamente implicados na aterogênese e outras condições inflamatórias. A abundância e variedade de quimiocinas derivadas do tecido adiposo, várias delas reguladas pelo IFN- $\gamma$ , certamente resultam em algum grau de redundância, e sugerem a possibilidade de uma atuação mútua de quimiocinas individuais no recrutamento de células inflamatórias na obesidade. Além disso, adipócitos estimulados por IFN- $\gamma$  também demonstraram expressão diferencial de importantes genes relacionados aos metabolismos glicêmico e de gorduras (não mostrado), enfatizando a noção de que, similarmente a outras citocinas (como o TNF- $\alpha$ ), o IFN- $\gamma$  também parece ter efeitos diretos em vias metabólicas dos adipócitos. Esses resultados sugerem que as células T no tecido adiposo podem, através de citocinas como o IFN- $\gamma$ , ter papéis regulatórios importantes, local e sistemicamente.

Em seguida à avaliação da relevância do IFN- $\gamma$  *in vitro*, seguimos com a análise de seu papel em sistemas mais complexos. O estudo da relevância do IFN- $\gamma$  na rede inflamatória do tecido adiposo *in vivo* se baseou na utilização de camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  e controles submetidos a dieta pobre ou rica em gorduras. Animais deficientes em IFN- $\gamma$  apresentaram redução significativa na expressão de genes inflamatórios no tecido adiposo, incluindo

quimiocinas e citocinas, em comparação a controles. Além disso, o acúmulo reduzido de macrófagos no tecido adiposo de camundongos obesos deficientes em IFN- $\gamma$  em comparação aos respectivos controles obesos confirmou as consequências funcionais da ação do IFN- $\gamma$  *in vivo* sobre a expressão de citocinas e quimiocinas no tecido adiposo. De fato, o papel do IFN- $\gamma$  na produção de citocinas e principalmente de quimiocinas por adipócitos sugeria sua provável relevância no acúmulo de células inflamatórias como os macrófagos no tecido adiposo.

Camundongos obesos deficientes em IFN- $\gamma$  também apresentaram níveis plasmáticos de leptina e colesterol total mais baixos e maior tolerância à glicose, resultados que fortalecem as consequências metabólicas sistêmicas da deleção de IFN- $\gamma$ .

A supressão significativa de diversos genes inflamatórios no tecido adiposo de camundongos com deficiência dupla do receptor de IFN- $\gamma$  e de ApoE em relação ao tecido adiposo de controles com deficiência única de ApoE fortalece adicionalmente os resultados anteriores. A interrupção da sinalização pelo IFN- $\gamma$  através da deficiência de seu receptor nesses animais reduziu significativamente a expressão de genes com papéis já estabelecidos no recrutamento de células T e na imunidade adaptativa em condições inflamatórias como a aterosclerose, como por exemplo o IP-10<sup>(57)</sup>, MIG<sup>(57)</sup>, RANTES<sup>(77, 78)</sup>, e I-A<sup>b</sup> <sup>(55, 75)</sup>. A estimulação por IFN- $\gamma$  também aumentou a expressão de todos esses genes em adipócitos diferenciados nos dados de microarray, novamente sugerindo uma interação entre o perfil Th1 da resposta imune e adipócitos. Os camundongos com deficiência dupla de IFN $\gamma$ R e ApoE também apresentaram menor expressão de CD3 no tecido adiposo em

comparação aos controles com deficiência única de ApoE, fortalecendo novamente a hipótese da atuação de uma alça autócrina em que células T podem perpetuar sua própria presença no tecido adiposo através do IFN- $\gamma$ . Em outras palavras, as células T podem produzir IFN- $\gamma$ , capaz de estimular a produção local de quimiocinas, as quais podem, por sua vez, atrair novas células T.

A importância da via do IFN- $\gamma$  na inflamação do tecido adiposo em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> evidenciada nos experimentos acima talvez ajude a explicar também a redução da aterosclerose em camundongos com deficiência dupla de IFN $\gamma$ R e ApoE observada em estudo anterior<sup>(59)</sup>, já que a inflamação tem sido aventada como um dos elos entre a obesidade e a doença aterosclerótica<sup>(46)</sup>. A supressão da sinalização pelo IFN- $\gamma$  em camundongos obesos com deficiência de ApoE também se associou a alterações nos metabolismos lipídico e glicêmico, similarmente ao que foi observado em animais C57BL/6, fornecendo suporte adicional ao impacto do IFN- $\gamma$  sobre vias metabólicas sistêmicas. Estudos prévios realizados em animais e em humanos confirmam os já mencionados efeitos do IFN- $\gamma$  sobre o sistema endócrino<sup>(79, 80)</sup>. Curiosamente, observações prévias *in vitro* apoiam um efeito estimulante direto do IFN- $\gamma$  sobre a lipólise e aumento do fornecimento de ácidos graxos não esterificados ao fígado<sup>(81, 82)</sup>. A importância dessa citocina nas defesas do hospedeiro e sua influência na mobilização de energia apresentam plausibilidade biológica e reafirmam a conexão entre as respostas inflamatórias e os desarranjos metabólicos também observada com outras citocinas, como por exemplo o TNF- $\alpha$ .

Nossos resultados apontam para a cooperação macrófago/célula T na obesidade, hoje reconhecida como condição inflamatória de longo prazo. A positividade do I-A<sup>b</sup> dos macrófagos no tecido adiposo fortalece a existência de uma rede entre essas células das imunidades inata e adaptativa. Em adição à já conhecida interação entre macrófagos infiltrantes e adipócitos na intimidade do tecido adiposo na obesidade, as células T também parecem participar dessa rede inflamatória através do IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  não é produzido exclusivamente pelas células T, apesar de sua classificação como citocina Th1 clássica. Estudos adicionais, como supressão seletiva do gene do IFN- $\gamma$  das células T, seriam necessários para estabelecer precisamente a fonte dessa citocina no tecido adiposo.

Nossos dados estabelecem que o IFN- $\gamma$ , clássica citocina Th1 tradicionalmente secretada por células T, pode promover inflamação no tecido adiposo. Esses resultados enfatizam a importância da exploração adicional da imunidade adaptativa e do papel das células T e seus produtos na obesidade.

Em seguida à publicação desses resultados (*Rocha, VZ. Circulation Research 2008; 103:467-476*), três artigos publicados em edição especial da *Nature Medicine* também investigaram e corroboraram o papel das células T e da imunidade adaptativa na inflamação do tecido adiposo. Nishimura e colaboradores observaram o acúmulo significativo de células T efectoras CD8<sup>+</sup> no tecido adiposo de camundongos que receberam dieta hipercalórica<sup>(83)</sup>. Os autores também demonstraram redução da infiltração de macrófagos e da inflamação com melhora da resistência insulínica mediante depleção genética e imunológica de células T CD8<sup>+</sup> <sup>(83)</sup>. Esses e outros achados sugerem um papel essencial das células T CD8<sup>+</sup> na iniciação e propagação da inflamação do



tecido adiposo na obesidade. Por outro lado, Feuerer investigou o papel das células T regulatórias no tecido adiposo e demonstrou que camundongos obesos apresentam número significativamente reduzido de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> em seu tecido adiposo em comparação ao de controles<sup>(84)</sup>. Experimentos de depleção ou administração de células T regulatórias revelaram conjuntamente que essas células parecem se opor à inflamação excessiva no tecido adiposo e às suas consequências sistêmicas<sup>(84)</sup>. Em sua publicação na mesma edição da *Nature Medicine*, Winer mostrou uma razão elevada de células Th1/células T regulatórias Foxp3<sup>+</sup> no tecido adiposo de camundongos e humanos obesos. Além disso, o tratamento com anticorpo específico anti-CD3 reduziu a predominância das células Th1 sobre as células Foxp3-positivas em camundongos obesos, revertendo a resistência à insulina<sup>(85)</sup>. Todas essas observações que se seguiram a nossa publicação forneceram suporte adicional ao conceito de participação da imunidade adaptativa, seja através de células T efetoras ou células T regulatórias e suas respectivas citocinas, na rede inflamatória do tecido adiposo e nas consequências metabólicas da obesidade.

O reconhecimento da presença de células T no tecido adiposo, e o aumento de seu número em um contexto de obesidade, motivaram também a investigação de um sistema quimiotático que permitisse o acúmulo local dessas células. MCP-1 e RANTES, quimiocinas abundantemente expressas no tecido adiposo de camundongos obesos, podem induzir a migração de diversos tipos celulares (incluindo células T) durante processos inflamatórios. Além disso, ambas as quimiocinas parecem participar crucialmente no acúmulo de macrófagos no tecido adiposo de camundongos e humanos obesos<sup>(42, 65, 86)</sup>.

Entretanto, a constatação de que o acúmulo de células T no tecido adiposo de camundongos obesos parece preceder o aparecimento dos macrófagos<sup>(66, 83)</sup> sugere a atuação de um sistema de quimiocina/receptor de quimiocina com seletividade mais alta para células T do que RANTES/CCR5 ou MCP1/CCR2. Nossos resultados demonstraram que CXCR3 participa do acúmulo de células T no tecido adiposo em contexto de obesidade. A ligação exclusiva de CXCR3 às quimiocinas IP-10, MIG e I-TAC, e sua maior expressão em células T ativadas, torna esse sistema quimiotático um candidato ideal para iniciar o recrutamento de células T no tecido adiposo de animais obesos, e assim, regular a inflamação local.

Nossos dados mostram um aumento significativo dos níveis de mRNA de CXCR3 em células derivadas do tecido adiposo periepididimal de camundongos C57BL6 obesos, comparados aos controles não-obesos. Considerando-se a expressão de CXCR3 principalmente em células T ativadas, esse achado fortalece adicionalmente a hipótese de acúmulo de células T ativadas no tecido adiposo na obesidade. A deficiência de CXCR3 em camundongos obesos se associou a um número significativamente menor de células CD3<sup>+</sup> no tecido adiposo, incluindo ambas as subpopulações de linfócitos T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Essa redução no número de células T ocorreu em ambos os períodos estudados, 8 e 16 semanas, com queda ainda mais pronunciada com 16 semanas. Dessa forma, apesar da diversidade e potencial importância de outras vias quimiotáticas na inflamação no tecido adiposo, esses resultados apontam um papel crucial do CXCR3 no acúmulo de células T no tecido adiposo de animais obesos ao longo do tempo. Diferentemente das células T, macrófagos e células dendríticas não se apresentaram em menor

número no tecido adiposo de camundongos obesos deficientes em CXCR3 em comparação aos controles. Curiosamente, após 16 semanas de dieta rica em gorduras, macrófagos foram mais numerosos no tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 em relação aos controles. Esse achado sugere que mudanças em subgrupos específicos de células T, como por exemplo, a redução no conteúdo de células T regulatórias no tecido adiposo, podem influenciar o número local de macrófagos. De fato, células T regulatórias apresentam efeitos supressivos sobre macrófagos e células T efetoras.

Números similares de células T e outras populações de leucócitos no sangue e baço de camundongos obesos deficientes em CXCR3 e controles fortalecem a hipótese de um efeito local do CXCR3 no acúmulo de células T no tecido adiposo de animais obesos, independentemente do número de células circulantes e periféricas.

As células T apresentam heterogeneidade funcional, segundo a qual diferentes subgrupos de células T podem exercer ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias em outras subpopulações de linfócitos e células do sistema imune inato. Em nosso estudo, a deficiência de CXCR3 no contexto da obesidade associou-se à redução dos níveis de mRNA de RANTES, tradicionalmente um produto de linfócitos T citotóxicos; e de MCP-1, quimiocina predominantemente secretada por macrófagos ativados. Por outro lado, camundongos obesos deficientes em CXCR3 também apresentaram expressão reduzida de IL-10, clássica citocina anti-inflamatória; e Foxp3, marcador de célula T regulatória. Esses resultados indicam que o CXCR3 participa do acúmulo de subpopulações distintas de células T, auxiliando na definição dos

perfis de expressão de moléculas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, presentes no tecido adiposo dos camundongos obesos. A deficiência de CXCR3 também reduz a expressão de arginase 1, marcador de macrófagos do tipo M2, ou seja, macrófagos ativados sob a forma alternativa. A arginase 1, que pode ser ativada por citocinas Th2 como o IL-10, está tipicamente envolvida em reparação tecidual e supressão da inflamação. A expressão reduzida de arginase 1 em camundongos deficientes em CXCR3 sugere que o sistema quimiotático CXCR3/IP10-Mig-ITAC indiretamente regula a função macrófagica no tecido adiposo de camundongos obesos.

A deficiência de CXCR3 se correlacionou com alterações significativas em variáveis metabólicas sistêmicas. Camundongos obesos com deficiência de CXCR3 apresentaram níveis plasmáticos reduzidos de colesterol e leptina, e maior tolerância à glicose do que os respectivos controles obesos após 8 semanas de dieta rica em gorduras. Entretanto, a diferença na tolerância à glicose entre os grupos perdeu a significância estatística após 16 semanas de dieta rica em gorduras, coincidindo com a queda significativa de expressão de marcadores anti-inflamatórios – incluindo IL-10, arginase, e Foxp3 – no tecido adiposo de camundongos com deficiência de CXCR3 em comparação a controles. Em concordância com esse achado, o tecido adiposo de camundongos deficientes em CXCR3 apresentou significativamente menos células Foxp3-positivas em relação aos controles, como determinado por análise imunohistoquímica, sugerindo um papel do CXCR3 também no acúmulo de células T regulatórias no tecido adiposo de camundongos obesos. Diversos estudos já demonstraram que um número reduzido de células anti-inflamatórias no tecido adiposo, como os macrófagos M2 e as células T

regulatórias e seus produtos, se associam a deterioração da homeostase metabólica<sup>(41, 84)</sup>, como anteriormente mencionado.

Nossos achados sugerem que a deficiência de CXCR3 interfere no acúmulo de subpopulações distintas e inclusive antagônicas de células T, e mudanças temporais no número de células nesses grupos podem alterar o balanço da expressão de moléculas proinflamatórias e anti-inflamatórias. O efeito resultante dessa dualidade entre forças proinflamatórias e anti-inflamatórias no tecido adiposo parece impactar os metabolismos local e sistêmico. Em nosso estudo, um número reduzido de células T efetoras no tecido adiposo de camundongos CXCR3-deficientes parece ter prevalecido com 8 semanas de dieta rica em gorduras, melhorando a tolerância à glicose. Após 16 semanas de dieta rica em gorduras, é possível que uma redução significativa de células T regulatórias tenha compensado a redução de células T efetoras, suprimindo a melhora na curva de tolerância à glicose.

## **6 Conclusões**

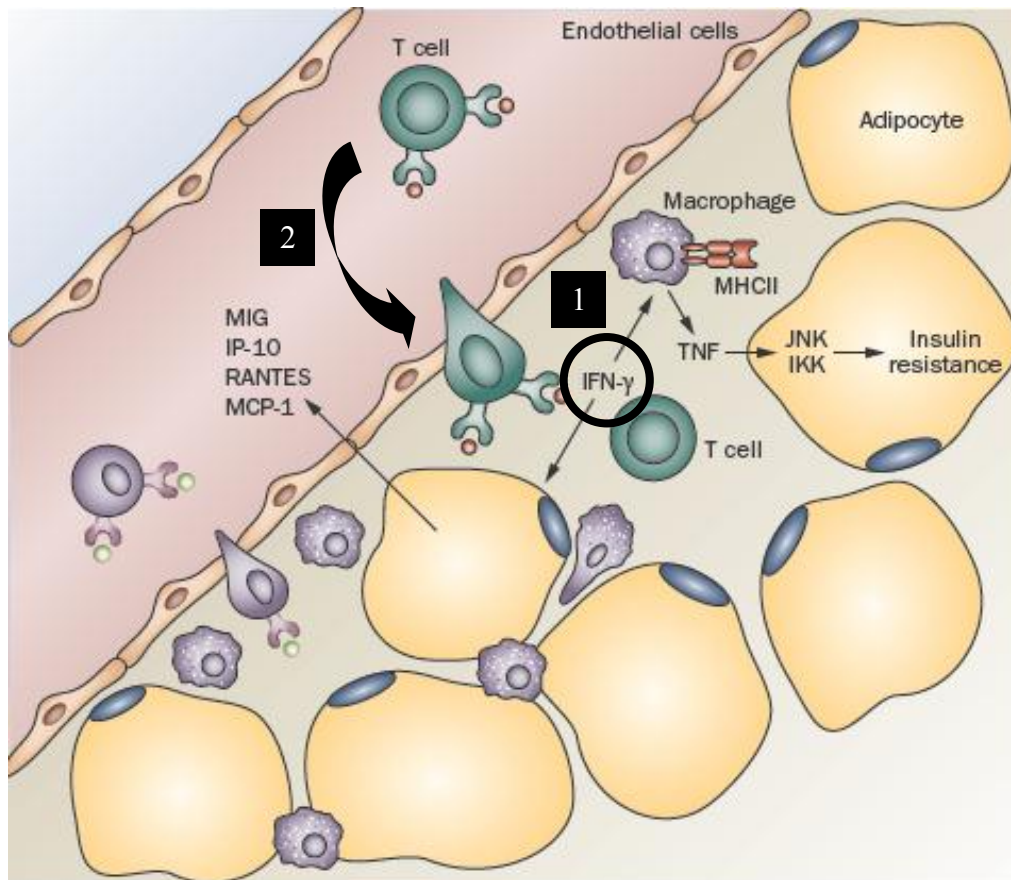
---

Esses resultados reunidos demonstraram a participação de elementos da imunidade adaptativa na rede inflamatória do tecido adiposo na obesidade, associada a impacto metabólico sistêmico.

No primeiro estudo, nossos dados mostraram que linfócitos T se acumulam no tecido adiposo de camundongos obesos, e que a citocina IFN $\gamma$ , classicamente secretada por linfócitos Th1, pode amplificar a inflamação local, e assim influenciar a produção de mediadores inflamatórios e o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, e também o metabolismo sistêmico.

O segundo estudo demonstrou um papel importante do receptor de quimiocinas CXCR3 no acúmulo de populações distintas de células T no tecido adiposo de camundongos obesos, também resultando em impacto na inflamação local e no metabolismo sistêmico.

A compreensão dos papéis de ambas as ramificações do sistema imune, inata e adaptativa, na fisiopatologia da obesidade pode ser mais um passo na direção de novas alternativas terapêuticas no tratamento dessa condição.



Adaptado de Rocha, V. Z. & Libby, P. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 399–409 (2009)

Abreviações: IFN- $\gamma$ , interferon-gama; IKK, quinase  $\kappa$ B; IP-10, proteína induzida por interferon-gama; JNK, quinase c-Jun N-terminal; MCP-1, proteína quimiotática de monócito 1; MHCII, complexo principal de histocompatibilidade classe II; MiG, monócina induzida por interferon-gama; Th1, célula *T-helper* tipo 1; TNF, fator de necrose tumoral

**Figura 21. A imunidade adaptativa na rede inflamatória do tecido adiposo na obesidade.** **1.** Através da produção da citocina Th1 IFN $\gamma$ , as células T podem modular as funções de macrófagos e adipócitos no tecido adiposo. O IFN $\gamma$  é capaz de induzir a produção de várias quimiocinas por adipócitos, como por exemplo, MCP-1, RANTES, IP-10, e MIG, que provavelmente podem facilitar o tráfego e acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos e células T, no tecido adiposo. Além disso, como consequência da estimulação por IFN $\gamma$ , macrófagos podem aumentar sua expressão de MHC II, e também secretar mais TNF, que por sua vez, pode induzir resistência insulínica local. **2.** Nossos resultados apontam para a importância do receptor de quimiocinas CXCR3 no acúmulo de células T no tecido adiposo. O receptor CXCR3 é capaz de regular o acúmulo de subpopulações distintas de células T, incluindo células T regulatórias.



## **7 Referências**

---

1. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1138-45.
2. Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med*. 2007;357(23):2329-37.
3. Rossner S. Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26 Suppl 4:S2-4.
4. Cornier MA, Despres JP, Davis N, Grossniklaus DA, Klein S, Lamarche B, et al. Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;124(18):1996-2019.
5. Hu G, Tuomilehto J, Silventoinen K, Sarti C, Mannisto S, Jousilahti P. Body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio on the risk of total and type-specific stroke. *Archives of internal medicine*. 2007;167(13):1420-7.
6. Strazzullo P, D'Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *Stroke*. 2010;41(5):e418-26.
7. Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, Kase CS, Cook NR, Manson JE, et al. Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation*. 2005;111(15):1992-8.
8. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA*. 1997;277(19):1539-45.
9. Gruson E, Montaye M, Kee F, Wagner A, Bingham A, Ruidavets JB, et al. Anthropometric assessment of abdominal obesity and coronary heart disease risk in men: the PRIME study. *Heart*. 2010;96(2):136-40.

10. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1990;322(13):882-9.
11. Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373(9669):1083-96.
12. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2211-9.
13. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):e6-e245.
14. Brown WV, Fujioka K, Wilson PW, Woodworth KA. Obesity: why be concerned? *Am J Med*. 2009;122(4 Suppl 1):S4-11.
15. de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J*. 2007;28(7):850-6.
16. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):497-511.
17. Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, et al. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes*. 1992;41(7):826-34.
18. Ross R, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(11):5044-51.

19. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
20. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature*. 1997;389(6651):610-4.
21. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-15.
22. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF  $\alpha$  by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97(4):1111-6.
23. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Moller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF- $\alpha$  and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(1):E108-14.
24. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
25. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80.
26. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
27. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004;116(2):337-50.
28. Rocha VZ, Libby P. The multiple facets of the fat tissue. *Thyroid*. 2008;18(2):175-83.

29. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79-83.
30. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*. 2002;360(9326):57-8.
31. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999;100(25):2473-6.
32. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001;103(8):1057-63.
33. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106(22):2767-70.
34. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jan 1;23(1):85-9.
35. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
36. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
37. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature reviews*. 2009;6(6):399-409.
38. Rocha VZ, Folco EJ. Inflammatory concepts of obesity. *International journal of Inflammation*. 2011:529061.

39. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
40. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
41. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
42. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-505.
43. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science.* 2001;293(5535):1673-7.
44. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420(6913):333-6.
45. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008;118(9):2992-3002.
46. Rocha VZ, Folco EJ. Inflammatory concepts of obesity. *International journal of inflammation.* 2011;2011:529061.
47. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271(5249):665-8.
48. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002;91(4):281-91.

49. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
50. Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(1):20-8.
51. Wright SD. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med.* 1999;189(4):605-9.
52. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986;6(2):131-8.
53. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1986;125(1):191-207.
54. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.
55. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.
56. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation.* 2000;102(24):2919-22.
57. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1041-50.
58. Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS, et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature.* 2000;403(6766):207-11.
59. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2752-61.

60. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2002;22(6):661-70.
61. Hansson GK. Atherosclerosis--an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007. *Atherosclerosis.* 2009;202(1):2-10.
62. Gotsman I, Gupta R, Lichtman AH. The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2493-5.
63. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 2006;12(2):178-80.
64. Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S364-9.
65. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation.* 2007;115(8):1029-38.
66. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1304-10.
67. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-24.
68. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in immunology.* 2001;22(2):83-7.



69. Veillard NR, Steffens S, Pelli G, Lu B, Kwak BR, Gerard C, et al. Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation*. 2005;112(6):870-8.
70. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation*. 2006;113(19):2301-12.
71. van Wanrooij EJ, de Jager SC, van Es T, de Vos P, Birch HL, Owen DA, et al. CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(2):251-7.
72. Whiteland JL, Nicholls SM, Shimeld C, Easty DL, Williams NA, Hill TJ. Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1995;43(3):313-20.
73. Elmendorf JS, Chen D, Pessin JE. Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTPgammaS) stimulation of GLUT4 translocation is tyrosine kinase-dependent. *J Biol Chem*. 1998;273(21):13289-96.
74. Chen JJ, Wang SJ, Tsai CA, Lin CJ. Selection of differentially expressed genes in microarray data analysis. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(3):212-20.
75. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(7):508-19.
76. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1785-8.
77. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. 2004;94(2):253-61.

78. Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, et al. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(2):373-9.
79. Memon RA, Feingold KR, Moser AH, Doerrler W, Grunfeld C. In vivo effects of interferon-alpha and interferon-gamma on lipolysis and ketogenesis. *Endocrinology.* 1992;131(4):1695-702.
80. Goldstein D, Gockerman J, Krishnan R, Ritchie J, Jr., Tso CY, Hood LE, et al. Effects of gamma-interferon on the endocrine system: results from a phase I study. *Cancer Res.* 1987;47(23):6397-401.
81. Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, et al. Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(21):8313-7.
82. Feingold KR, Doerrler W, Dinarello CA, Fiers W, Grunfeld C. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology.* 1992;130(1):10-6.
83. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15(8):914-20.
84. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15(8):930-9.
85. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009;15(8):921-9.
86. Keophipath M, Rouault C, Divoux A, Clement K, Lacasa D. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(1):39-45.



**Anexo A. Sequências dos primers**

<b>Gene</b>	<b>Primer <i>Forward</i></b>	<b>Primer <i>Reverse</i></b>
TNF $\alpha$	5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'
CD68	5'-CTCTCTAAGGCTACAGGCTGCT-3'	5'-TCACGGTTGCAAGAGAAACA-3'
MCP-1	5'-GGCTGGAGAGCTACAAGAGG-3'	5'-TCTTGAGCTTGGTGACAAAAC-3'
RANTES	5'-AGCAGCAAGTGCTCCAATC-3'	5'-GGGAAGCGTATACAGGGTC-3'
IL-10	5'-ACTGCACCCACTTCCCAGT-3'	5'-TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT-3'
STAT-1	5'-TGAGATGTCCCGGATAGTGG-3'	5'-CGCCAGAGAGAAATTCGTGT-3'
IFN $\gamma$	5'-TCTGGAGGAACTGGCAAAG-3'	5'-TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG-3'
IP-10	5'-GCTGCCGTCATTTTCTGC-3'	5'-TCTCACTGGCCCGTCATC-3'
MIG	5'-CTTTTCCTTTTGGGCATCAT-3'	5'-GCATCGTGCATTCCTTATCA-3'
CXCR3	5'-GCCAAGCCATGTACCTTGAG-3'	5'-GGAGAGGTGCTGTTTTCCAG-3'
I-A <sup>B</sup>	5'-GTGGTGCTGATGGTGCTG-3'	5'-CCATGAACTGGTACACGAAATG-3'
CD3	5'-TCCCAACCCAGACTATGAGC-3'	5'-GCGATGTCTCTCCTATCTGTCA-3'
GAPDH	5'-TGGGTGTGAACCATGAGAAG-3'	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGTC-3'

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral; MCP-1: proteína quimiotática de monócito; RANTES; IL-10: interleucina-10; STAT-1: transdutor de sinal e ativação da transcrição 1; IFN- $\gamma$  interferon-gama; IP-10: proteína induzida por interferon-gama; MIG: monocina induzida por interferon-gama; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

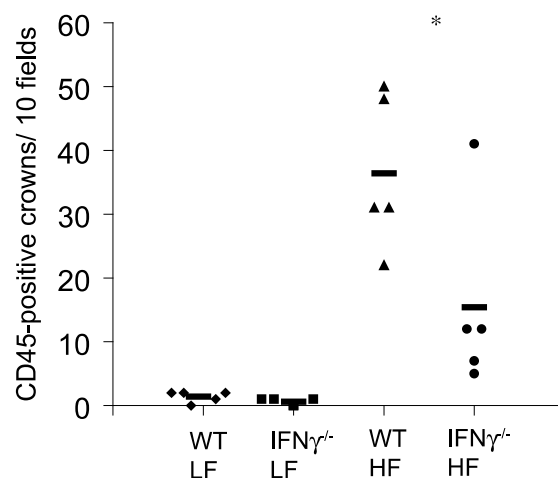
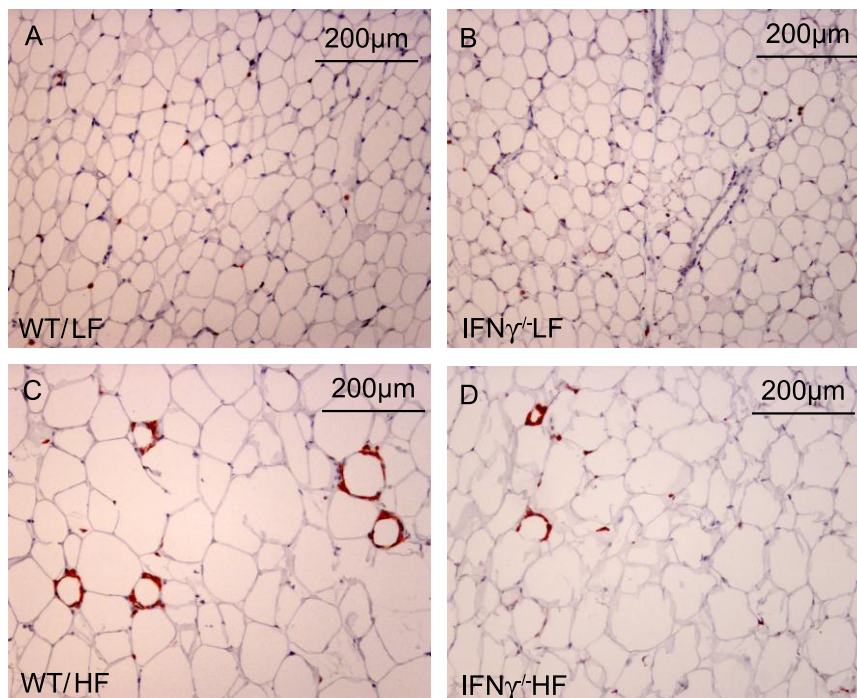
## Anexo B. Estudo de perfil transcricional

Células 3T3-L1 diferenciadas foram estimuladas com 100 U/ml de IFN- $\gamma$  recombinante de camundongo ou deixadas sem tratamento (controles). Após 4 e 24 horas, controles e células tratadas foram coletadas e mRNA extraído e utilizado em um screening de microarray. A tabela mostra as quimiocinas e receptores CC e CXC que se modificaram significativamente em comparação aos controles, ordenados de acordo com seu valor de p em 24 h. n=5 para cada grupo em 4h, e n=6 para cada grupo em 24 h.

Gene	Other denominations	4h		24h	
		paired t statistic	paired p value	paired t statistic	paired p value
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Cxcl9, Mig	5.159	0.006703	31.630	0.000001
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10, IP-10	5.316	0.006020	20.312	0.000005
Chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5, RANTES	4.797	0.008668	16.707	0.000014
Chemokine (C-C motif) ligand 8	Ccl8, MCP-2	9.577	0.000664	16.511	0.000015
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxcl11, I-TAC	3.984	0.016351	8.116	0.000461
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2, MCP-1	3.645	0.021865	6.508	0.001279
Chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7, MCP-3	3.851	0.018286	5.907	0.001980
Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13, BLC, BCA-1	4.013	0.015961	5.281	0.003243
Chemokine (C-C motif) receptor-like 1	Ccr1	0.195	NS	5.151	0.003613
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2, GRO- $\beta$ , MGSA- $\beta$	12.422	NS	4.976	0.004190
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12, SDF-1 $\alpha/\beta$	14.831	NS	4.007	0.010249
Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Cxcr3	14.784	NS	3.999	0.010336
Chemokine (C-C motif) ligand 25	Ccl25, TECK	3.378	0.027842	3.934	0.011023
Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	3.317	0.029452	3.858	0.011907
Chemokine (C-X-C motif) ligand 7	Cxcl7, NAP-2	0.515	NS	3.734	0.013510
Chemokine (C-C motif) receptor 1	Ccr1	2.744	NS	3.619	0.015239
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1, GRO- $\alpha$ , MGSA- $\alpha$	14.008	NS	3.403	0.019192
Chemokine (C-X-C motif) ligand 15	Cxcl15	1.027	NS	3.016	0.029567
Chemokine (C-C motif) ligand 28	Ccl28, MEC	27.063	NS	2.771	0.039325
Chemokine (C-C Motif) Ligand 12	Ccl12	8.944	0.000864	22.227	NS
Chemokine (C-X3-C Motif) Ligand 1	Cx3cl1, Fractalkine	6.665	0.002632	11.542	NS
Chemokine (C-C Motif) Ligand 4	Ccl4, MIP-1 $\beta$	4.243	0.013233	12.488	NS
Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Cx3cr1	3.384	0.027684	10.979	NS

**Anexo C.** A deficiência de IFN $\gamma$  limita o número de formações tipo “coroa” (*crown-like*) no tecido adiposo visceral

O tecido adiposo periepididimal foi fixado em parafina. Secções foram marcadas com anticorpo anti-CD45 (marcador de leucócitos), e "coroas" foram contadas em 10 campos consecutivos em cada slide. Uma "coroa" é o resultado de células positivas ao redor de um adipócito. Uma figura representativa de cada grupo é mostrada (A-D). Números de cada grupo foram plotados no gráfico (E). As comparações entre as médias foram realizadas através do *Student's t test*. WT/LF, controles não-obesos; IFN $\gamma^{-/-}$ /LF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  não-obesos; WT/HF, controles obesos; IFN $\gamma^{-/-}$ /HF, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  obesos \* $p < 0.05$ ; n=5-6 em cada grupo.

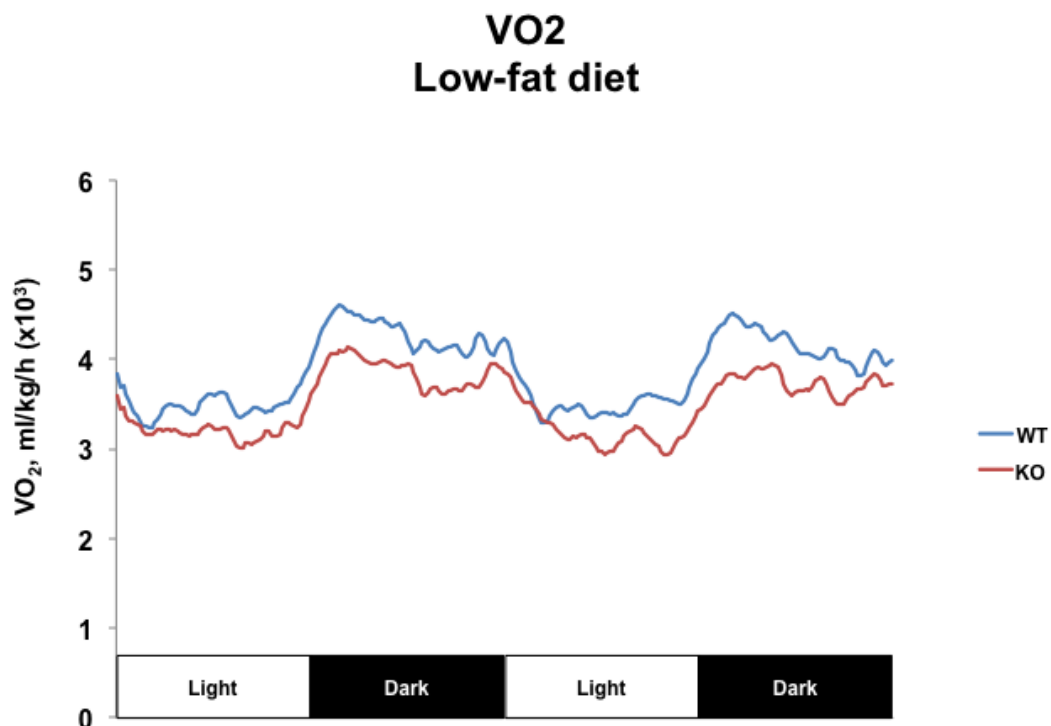


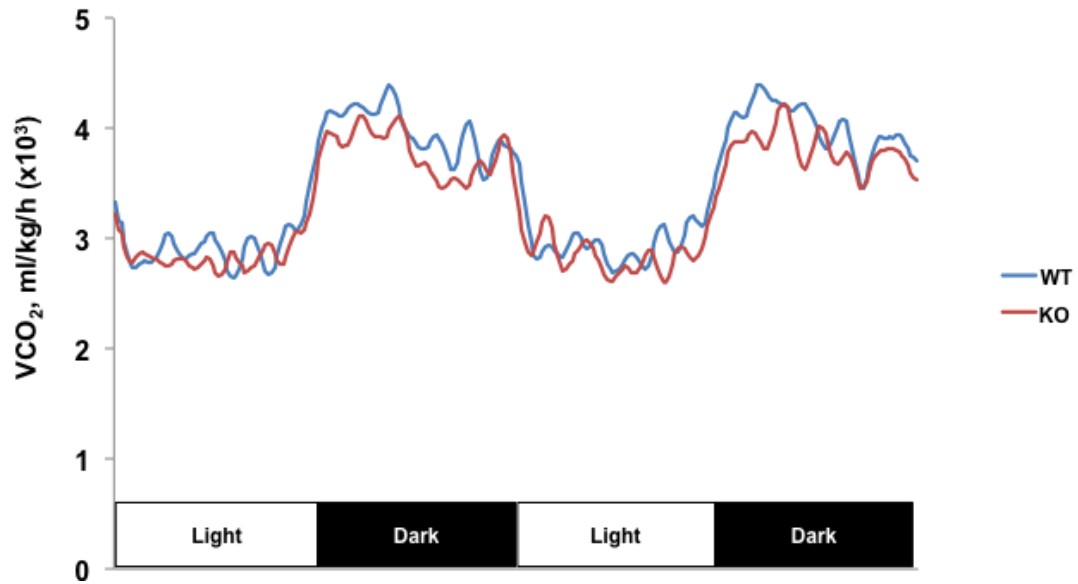
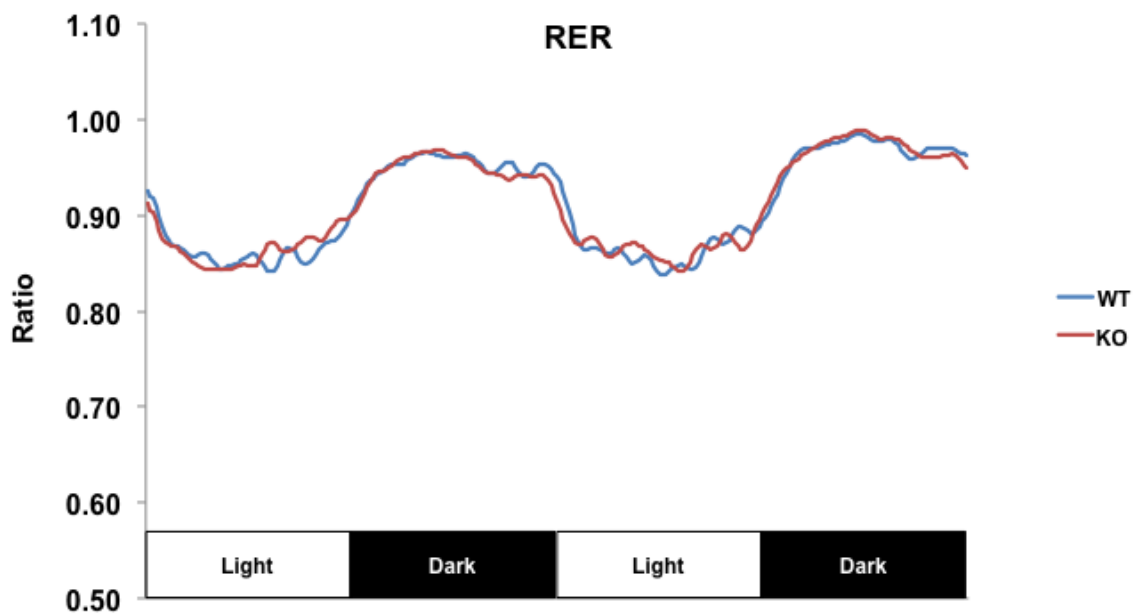
**Anexo D.** Camundongos e controles CXCR3 deficiente apresentou gasto energético semelhante e um pouco diferente da ingestão de alimentos e movimento

Camundongos foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas e submetidos a monitoramento não-invasivo de trocas gasosas, atividade física e ingestão alimentar. Índices (ml/kg/h) de consumo de O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) e produção de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) foram determinados em intervalos de 11 min e foram normalizados para o peso corporal. O consumo alimentar foi medido por gravimetria. As atividades foram medidas por *beam breaks* ao longo da parte inferior das gaiolas. As medições foram realizadas em camundongos deficientes em CXCR3 (KO) e controles (WT), antes (A, B, C, D, E, F) e depois de 4 semanas de dieta rica em gordura (G, H, I, J, L, M).

A significância estatística de dados metabólicos foi analisada por meio do teste t de Student não pareado \* p <0,05.; n = 6 em cada grupo

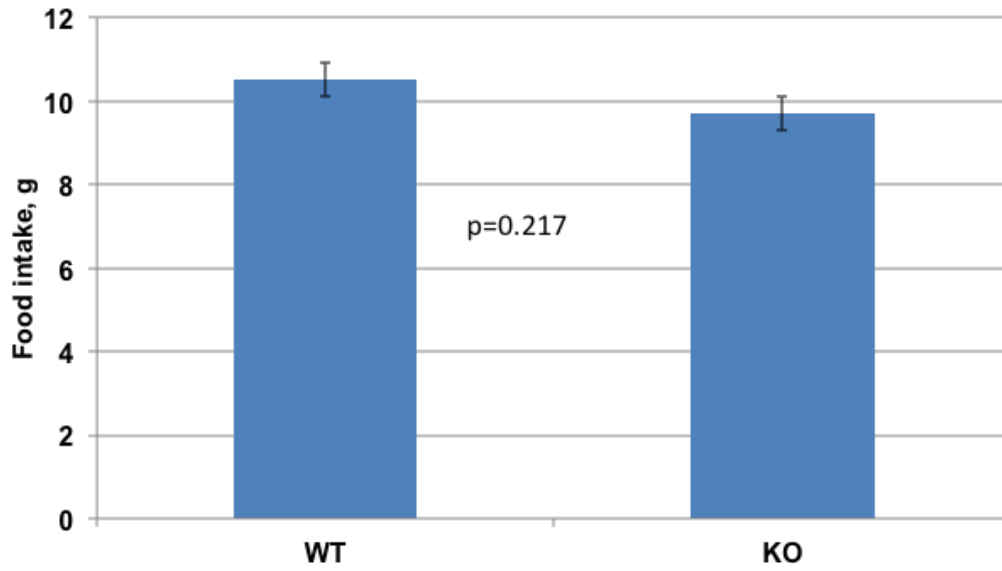
**A**



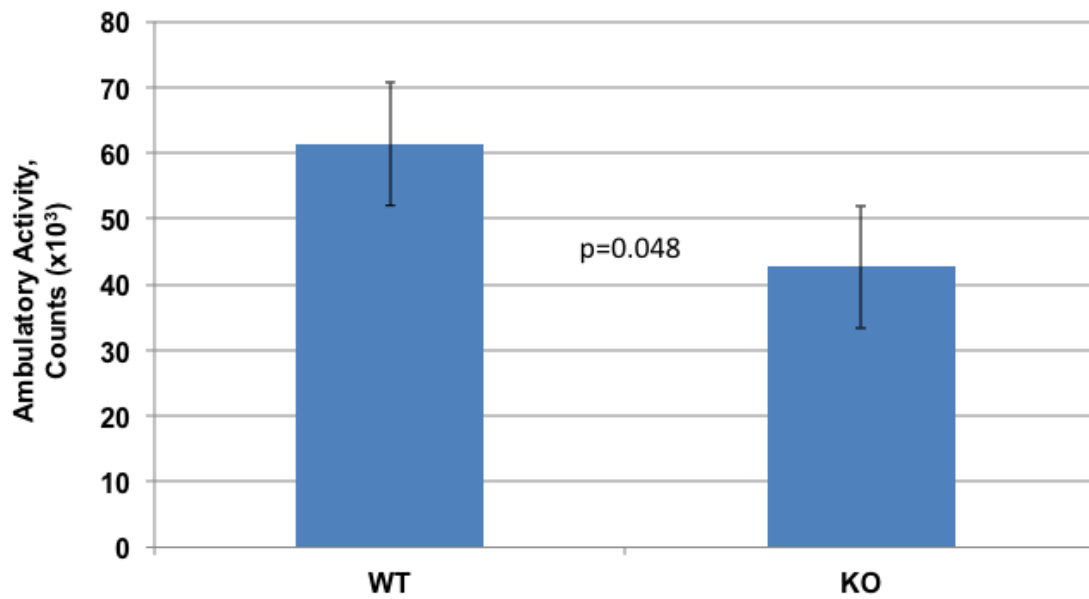
**B****VCO<sub>2</sub>  
Low-fat diet****C****RER  
Low-fat diet**



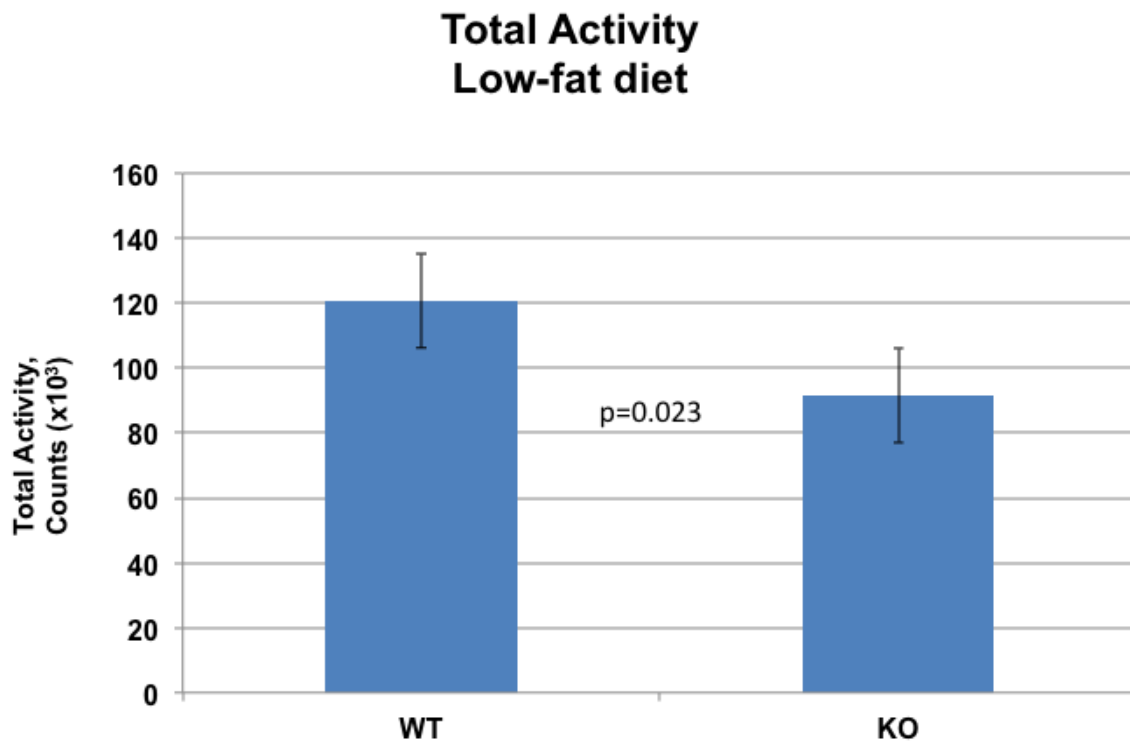
D

**Total food intake in 48 hrs  
Low-fat diet**

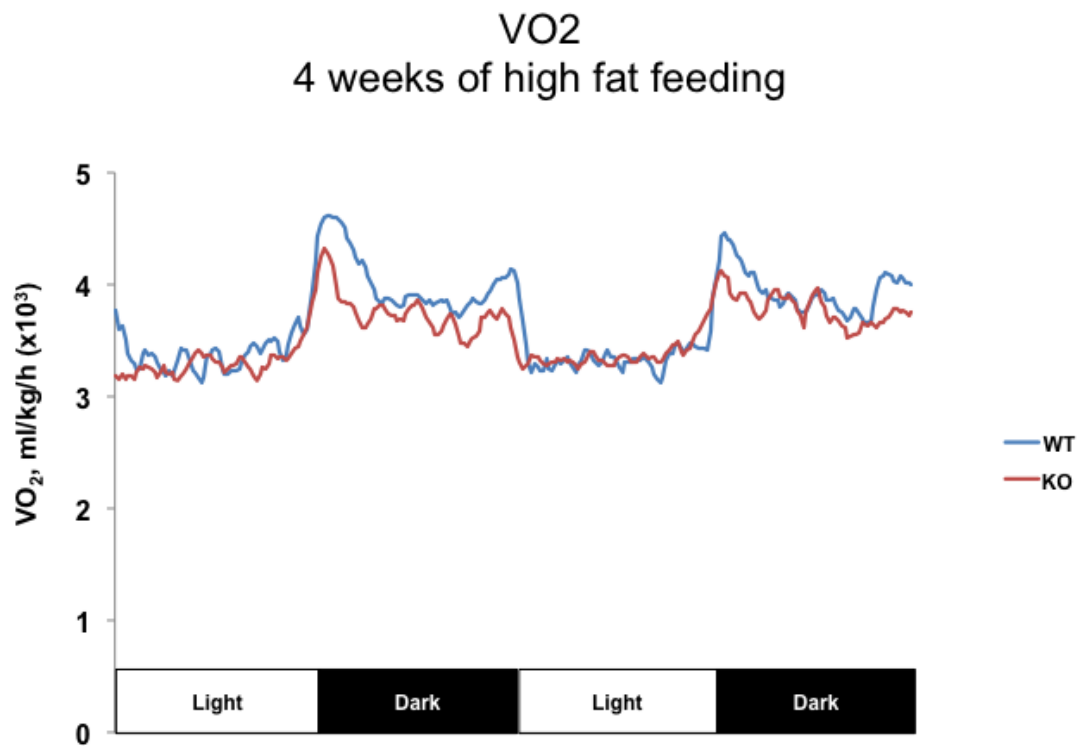
E

**Ambulatory Activity  
Low-fat diet**

F

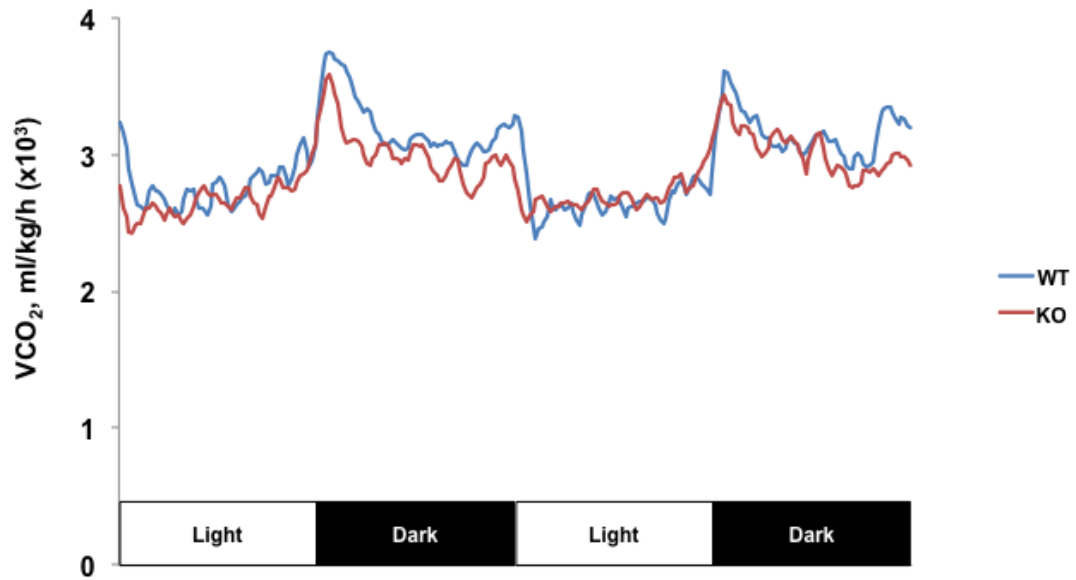


G



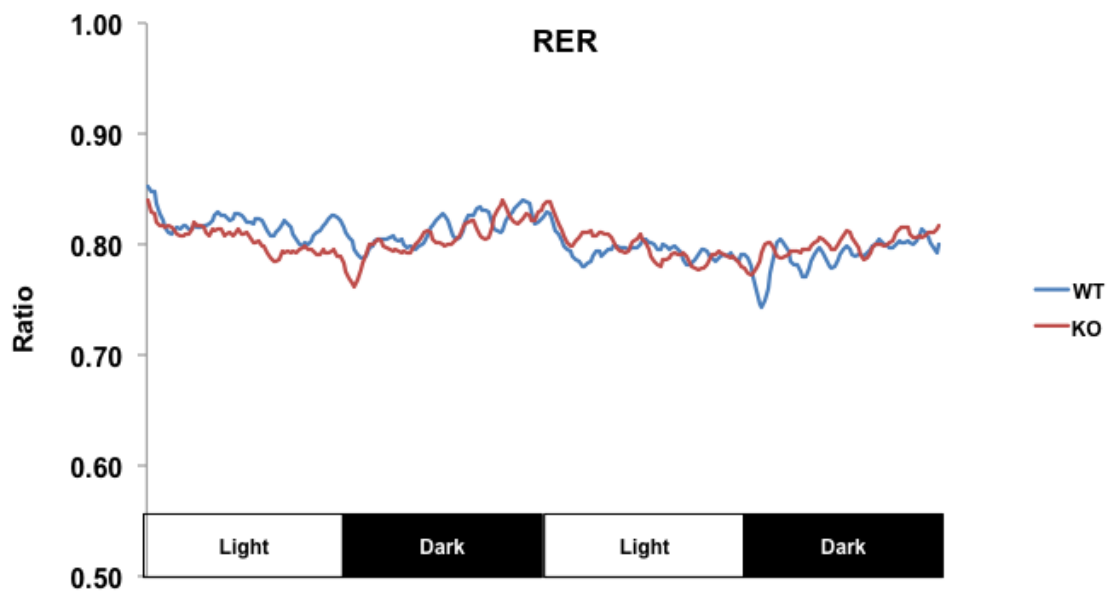
H

VCO<sub>2</sub>  
4 weeks of high fat feeding



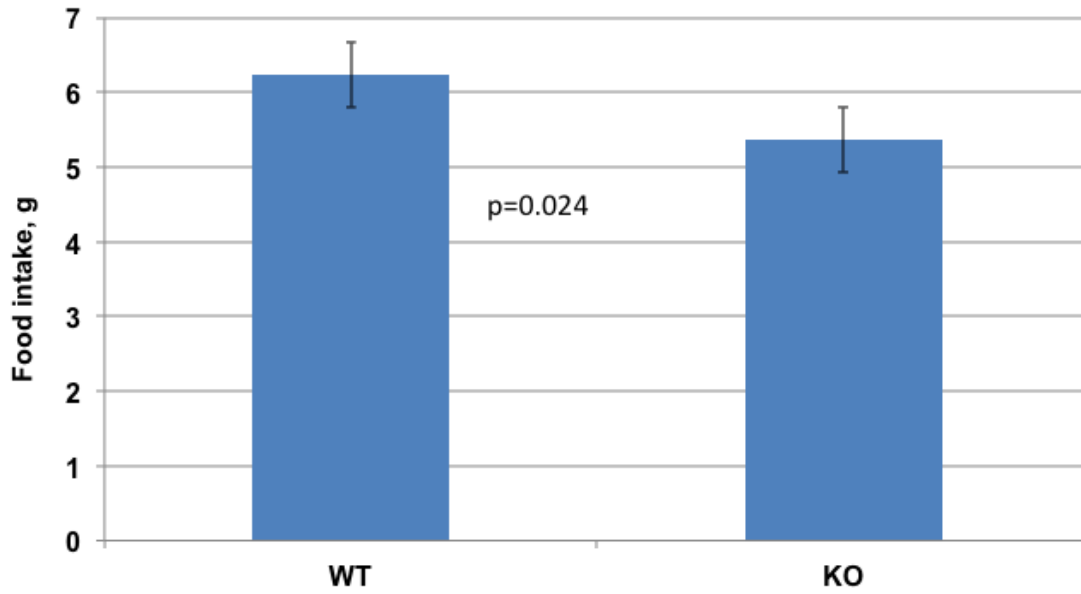
I

RER  
4 weeks of high fat feeding



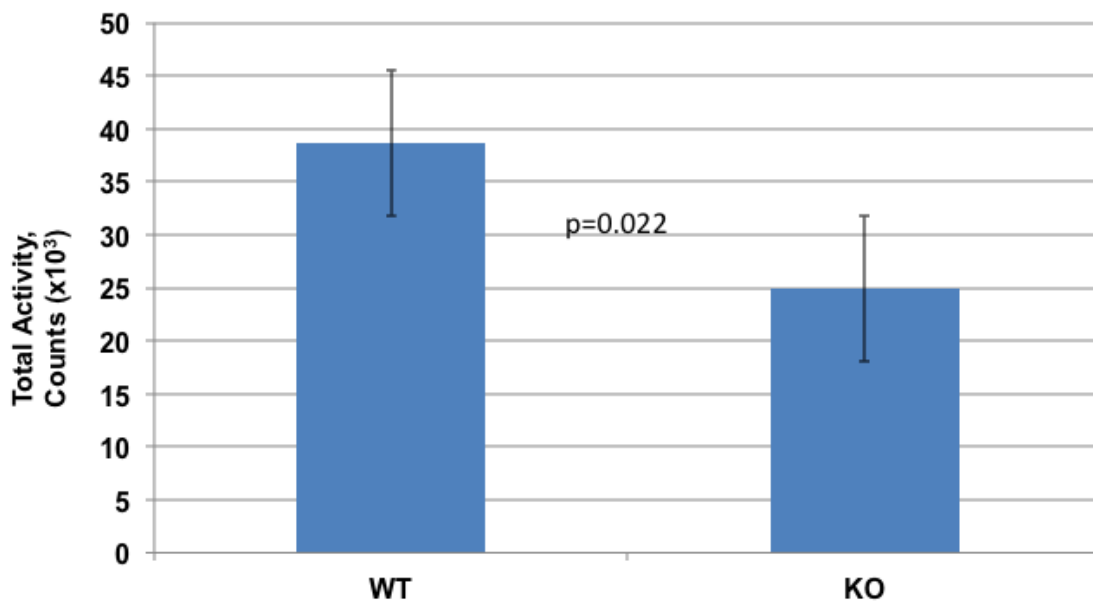
J

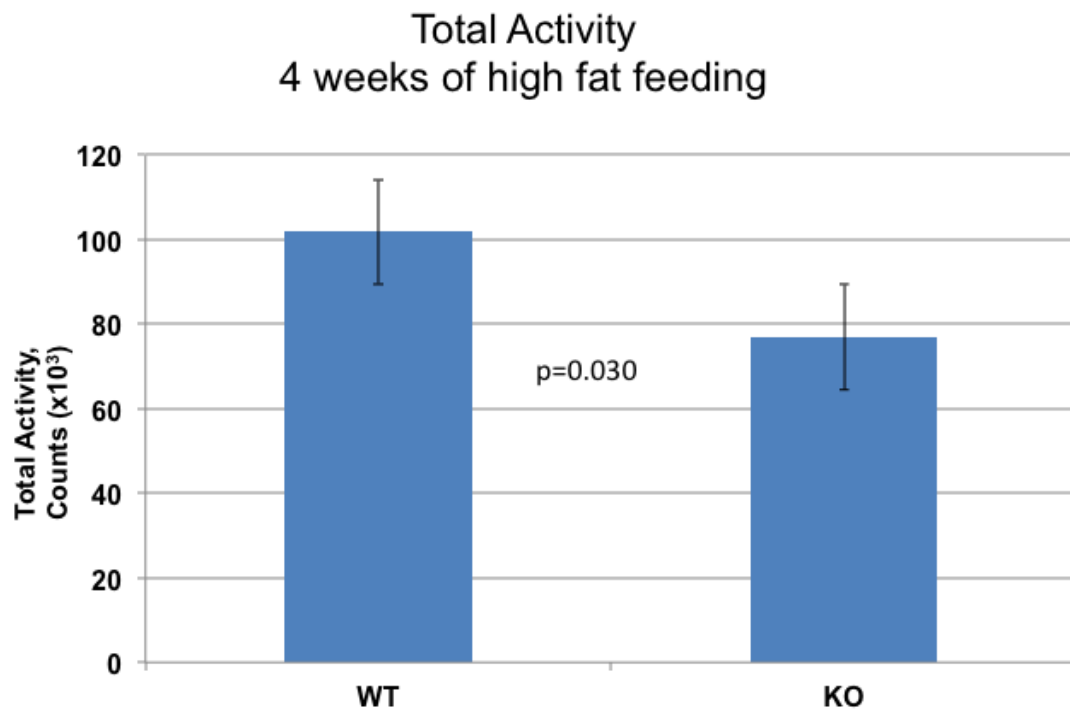
Food intake in 48 hrs  
4 weeks of high fat feeding



L

Ambulatory Activity  
4 weeks of high fat feeding



**M**

## Anexo E. Publicações

## Molecular Medicine

## Interferon- $\gamma$ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation A Role for Adaptive Immunity in Obesity

Viviane Zorzanelli Rocha, Eduardo J. Folco, Galina Sukhova, Koichi Shimizu, Israel Gotsman, Ashley H. Vernon, Peter Libby

**Abstract**—Adipose tissue (AT) can accumulate macrophages and secrete several inflammatory mediators. Despite its pivotal role in the progression of chronic inflammatory processes such as atherosclerosis, the adaptive role of immunity in obesity remains poorly explored. Visceral AT of diet-induced obese C57BL/6 mice had higher numbers of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells than lean controls, monitored by flow cytometry. When stimulated *in vitro*, T cells from obese AT produced more interferon (IFN) $\gamma$  than those from controls. AT from obese animals also had more cells expressing I-A<sup>b</sup>, a mouse class II histocompatibility marker implicated in antigen presentation, as determined by immunostaining. Differentiated 3T3-L1 cells stimulated with recombinant IFN $\gamma$  or T-helper 1–derived supernatant produced several chemokines and their mRNAs. Obese IFN $\gamma$ -deficient animals had significantly reduced AT expression of mRNA-encoding inflammatory genes such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1, decreased AT inflammatory cell accumulation, and better glucose tolerance than control animals consuming the same diet. Obese mice doubly deficient for IFN $\gamma$  receptor and apolipoprotein (Apo)E on a mixed 129SvEv/C57BL/6 (129/B6) genetic background, despite exhibiting similar AT mRNA levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 as 129/B6-ApoE<sup>-/-</sup> controls, had decreased expression of important T cell–related genes, such as IFN $\gamma$ -inducible protein-10 and I-A<sup>b</sup>, and lower plasma triglycerides and glucose. These results indicate a role for T cells and IFN $\gamma$ , a prototypical T-helper 1 cytokine, in regulation of the inflammatory response that accompanies obesity. (*Circ Res.* 2008;103:467-476.)

**Key Words:** inflammation ■ obesity ■ adipose tissue ■ T cell ■ IFN $\gamma$

The recent development of a worldwide obesity pandemic has gained wide recognition.<sup>1,2</sup> Approximately two-thirds of US adults are either overweight or obese.<sup>3</sup> These alarming statistics portend a gigantic health burden, because excess adiposity entrains an array of atherogenic risk factors, including diabetes and dyslipidemia.<sup>4</sup> From a mechanistic perspective, both obesity and atherosclerosis involve chronic low-grade inflammation.

Obesity associates with macrophage accumulation in white adipose tissue (AT),<sup>5,6</sup> where these infiltrating cells interact with adipocytes and endothelial cells, comprising a local inflammatory network.<sup>7–9</sup> This crosstalk results in the production of multiple cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ <sup>5</sup> and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1,<sup>10</sup> which can activate, propagate, and sustain the local inflammatory response in AT.<sup>11</sup>

Similarly, the inflammatory process within the arterial wall that characterizes atherosclerosis involves accumulation and activation of macrophages.<sup>12–14</sup> These phagocytes in atheromata also interact with local cells and secrete

multiple mediators that modulate lesion evolution and complication. Other leukocytes also contribute to atherosclerosis. T cells orchestrate the inflammatory cascade evolution, depending on the set of cytokines they predominantly produce, T helper (Th)1 or Th2.<sup>12,13,15</sup> Interferon (IFN) $\gamma$ , the signature Th1 cytokine, elicits the production of macrophage mediators, induces leukocyte adhesion molecules, chemokines, and class II major histocompatibility antigens and increases antigen-presenting capacity by macrophages and endothelial cells.<sup>16–18</sup> The enhanced antigen-presenting capacity of these cells can participate in adaptive immunity, an important contributor to the progression of atherosclerotic lesions.<sup>18</sup> Yet, the role of T cells in AT remains poorly explored. A previous study reported a greater number of T cells in white AT of mice fed a high-fat diet,<sup>19</sup> but the operation of Th1 cytokines such as IFN $\gamma$  in the AT inflammatory network remains unknown.

The present study examined the participation of T cells, particularly of the signature Th1 cytokine IFN $\gamma$ , in the setting of fat inflammation. *In vitro* data show that IFN $\gamma$  modulates

Original received April 9, 2008; revision received July 9, 2008; accepted July 15, 2008.

From the Cardiovascular Division (V.Z.R., E.J.F., G.S., K.S., P.L.) and Division of General and Gastrointestinal Surgery (A.H.V.), Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Mass; and Heart Institute (I.G.), Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel.

Correspondence to Peter Libby, MD, Cardiovascular Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 77 Ave Louis Pasteur, Boston, MA, 02115. E-mail plibby@rics.bwh.harvard.edu

© 2008 American Heart Association, Inc.

*Circulation Research* is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.177105

# Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

## CXCR3 Controls T-Cell Accumulation in Fat Inflammation

Viviane Zorzanelli Rocha, Eduardo J. Folco, Cafer Ozdemir, Yuri Sheikine, Thomas Christen, Galina K. Sukhova, Eva H.C. Tang, Marcio Sommer Bittencourt, Raul D. Santos, Andrew D. Luster, David E. Cohen and Peter Libby

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* published online May 8, 2014;  
*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is published by the American Heart Association, 7272  
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231  
Copyright © 2014 American Heart Association, Inc. All rights reserved.  
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the  
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/early/2014/05/08/ATVBAHA.113.303133>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2014/05/08/ATVBAHA.113.303133.DC1.html>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:  
<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:  
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

# Circulation Research

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



## Announcement

*Circ Res.* 2010;106:1

doi: 10.1161/RES.0b013e3181cd98ee

*Circulation Research* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2010 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/content/106/1/1>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:  
<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Circulation Research* is online at:  
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>



## Announcement

### *Circulation Research*

#### 2009 Best Manuscript Awards

The *Best Manuscript Awards* are bestowed annually by the Editors of *Circulation Research* to recognize the most outstanding articles published in the journal. The winners of the *2009 Best Manuscript Awards* were selected from volumes 103 and 104 on the basis of novelty, impact, methodology, number of online downloads by *Circulation Research* readers, and citations of each article as determined by ISI. The winners represent some of the very best work published in *Circulation Research*. These nonmonetary awards were presented at the Editorial Board dinner in Orlando, Florida, on November 15, 2009.

**Juan M. Melero-Martin, Maria E. De Obaldia, Soo-Young Kang, Zia A. Khan, Lei Yuan, Peter Oettgen, and Joyce Bischoff**  
Engineering Robust and Functional Vascular Networks In Vivo With Human Adult and Cord Blood-Derived Progenitor Cells  
*Circ Res.* 2008;103:194–202

**Viviane Zorzanelli Rocha, Eduardo J. Folco, Galina Sukhova, Koichi Shimizu, Israel Gotsman, Ashley H. Vernon, and Peter Libby**  
Interferon- $\gamma$ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation: A Role for Adaptive Immunity in Obesity  
*Circ Res.* 2008;103:467–476

**Rudy F. Duisters, Anke J. Tijssen, Blanche Schroen, Joost J. Leenders, Viola Lentink, Ingeborg van der Made, Veronica Herias, Rick E. van Leeuwen, Mark W. Schellings, Paul Barenbrug, Jos G. Maessen, Stephane Heymans, Yigal M. Pinto, and Esther E. Creemers**  
miR-133 and miR-30 Regulate Connective Tissue Growth Factor: Implications for a Role of MicroRNAs in Myocardial Matrix Remodeling  
*Circ Res.* 2009;104:170–178

**Elvira Haas, Indranil Bhattacharya, Eugen Brailoiu, Marlen Damjanovic, G. Cristina Brailoiu, Xin Gao, Laurence Mueller-Guerre, Nicole A. Marjon, André Gut, Roberta Minotti, Matthias R. Meyer, Kerstin Amann, Emerita Ammann, Ana Perez-Dominguez, Michele Genoni, Deborah J. Clegg, Nae J. Dun, Thomas C. Resta, Eric R. Prossnitz, and Matthias Barton**  
Regulatory Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor for Vascular Function and Obesity  
*Circ Res.* 2009;104:288–291

**Jianhua Zhang, Gisela F. Wilson, Andrew G. Soerens, Chad H. Koonce, Junying Yu, Sean P. Palecek, James A. Thomson, and Timothy J. Kamp**  
Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells  
*Circ Res.* 2009;104:e30–e41



Winners of the Best Manuscript Awards 2009 presented at the *Circulation Research* Editorial Board dinner in Orlando, Florida.