UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Papel da amilóide sérica A (SAA) nos processos de proliferação e
diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

Fabíola Branco Filippin Monteiro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Ana Campa

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Monteiro, Fabíola Branco Filippin
M775p Papel da amilóide sérica A (SAA) nos processos de
proliferação e diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 /
Fabíola Branco Filippin Monteiro. -- São Paulo, 2010.
90p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Campa, Ana

1. Bioquímica clínica 2. Lipídio : Bioquímica clínica
I. T. II. Campa, Ana, orientador

616.0756 CDD

Fabíola Branco Filippin Monteiro

Papel da amilóide sérica A (SAA) nos processos de proliferação e
diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª. Drª. Ana Campa
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, dezembro de 2010.

*A vida é curta,
A arte é longa,
A oportunidade fugaz,
A experiência falaciosa,
O julgamento difícil.*

(Hipócrates)

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que ilumina os meus caminhos e Que, a cada dia, me permite viver com alegria.

Ao meu amado marido Éder,

*meu amor e gratidão em reconhecimento à compreensão e carinho que foram
fundamentais para continuar tentando.*

*Aos meus queridos pais e irmãos, meu carinho e minha gratidão em
reconhecimento ao amor incondicional, e pelo exemplo de vida retilínea que
norteia minha existência.*

AGRADECIMENTOS

A Ana Campa, pela oportunidade, pela orientação e pelo exemplo de pessoa íntegra, dedicada e idônea, capaz de transmitir conhecimento de forma tão natural.

Ao Profº Dr. Raul Cavalcante Maranhão, pela oportunidade.

A Profª. Primavera Garcia Borelli, pelo estímulo e orientação no momento da transição.

Às Amigas Iara e Thais, pelo estímulo, apoio em todos os momentos e pela eterna amizade.

A todos do laboratório de Bioquímica Clínica, pelo pronto auxílio sempre que necessário.

Ao Edson, Talita, Silvana e Carolzinha, que estiveram comigo sempre, que foram meu braço direito.

A Silene e a todos os funcionários do Departamento de Análises, pelo carinho e presteza.

A todos os colaboradores do ICB-USP e IQ-USP.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	03
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
REVISÃO DA LITERATURA.....	10
Amilóide sérica A (SAA).....	10
O tecido adiposo e a inflamação.....	14
Modelo de adipogênese – pré-adipócitos 3T3-L1.....	18
Proliferação de células 3T3-L1.....	19
Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.....	21
Pré-adipócitos 3T3-L1 e SAA.....	27
OBJETIVOS.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Reagentes.....	31
Células e condições de cultura.....	31
Proliferação celular pela incorporação de [metil-³H]-Timidina ao DNA.....	32
Avaliação do ciclo celular.....	33
Necrose e apoptose.....	34
Vias de sinalização na proliferação celular pela incorporação de [metil-³H]- timidina ao DNA.....	35
Determinação do triacilglicerol intracelular.....	35
Expansão clonal mitótica (MCE).....	36
Determinação do glicerol.....	36
Expressão gênica na diferenciação celular.....	37

Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA).....	38
Reação da transcriptase reversa (RT).....	38
Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	39
Sistema de detecção SYBR® Green.....	40
Sistema de amplificação <i>TaqMan</i> ®.....	41
Determinação das citocinas TNF-α, IL-6 e da proteína SAA3.....	42
Captação de 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose.....	42
Análise estatística.....	43
8 RESULTADOS.....	43
Proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1.....	43
rSAA aumenta a viabilidade de células 3T3-L1.....	43
Ação mitogênica da rSAA sobre células 3T3-L1.....	43
Ciclo celular de células 3T3-L1 e efeitos da SAA.....	45
Vias de sinalização celular na proliferação estimulada por rSAA.....	48
Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.....	52
Expansão clonal mitótica (MCE).....	52
Diferenciação de células 3T3-L1.....	54
Expressão gênica durante a diferenciação.....	57
Metabolismo nos pré-adipócitos 3T3-L1.....	60
Citocinas pró-inflamatórias e a proteína SAA3 na diferenciação de 3T3-L1.....	63
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÕES.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	73

1 LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
AFITC	anexina V ligada ao fluorocromo FITC
BMP-3	<i>bone morphogenetic protein-3</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
CCL20	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CCR2	receptor do MCP-1
CD36	receptor <i>scavenger</i>
cDNA	DNA complementar
CPM	cintilações por minuto
CS	<i>calf serum</i>
CST3	cistatina C
Ct	ciclo de <i>threshold</i>
DEX	dexametasona
DMEM	<i>dulbecco's modified Eagle's</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FPR2	<i>formyl-peptide receptor 2</i>

GLUT-4	receptor de glicose tipo 4
HDL	lipoproteína de alta densidade
IBMX	isobutilmetilxantina
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	receptor do IGF-1
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal
IRS	substratos do receptor de insulina
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KRH	<i>Krebs–Ringer-Phosphate</i>
M1	macrófagos classicamente ativados
M2	macrófagos residentes
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCE	expansão clonal mitótica
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDI	meio de diferenciação
MMP	metaloproteinases
NO	óxido nítrico
OmpA	<i>membrane protein A</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase

PI	iodeto de propídio
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinase
PMFS	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
POPOP	(1,4-di 2,5-feniloxazol) benzeno)
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPO	2,5-difeniloxazol
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
rSAA	SAA recombinante
RT	transcriptase reversa
SAA	amilóide sérica A
SELS	selenoproteína S
SFB	soro fetal bovino
SR-BI	receptor <i>scavenger</i> classe B
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TCA	ácido tricloroacético
TLR	receptor <i>Toll-Like</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral

Considerando que a SAA é uma proteína de fase aguda e que uma concentração elevada desta proteína é observada em pacientes obesos e com resistência à insulina, estimulou-se pré-adipócitos murinos 3T3-L1 a baixas concentrações de rSAA durante o processo de proliferação e diferenciação. Ensaio de incorporação de [metil-³H]-timidina, ciclo e viabilidade celular por citometria de fluxo foram realizados, assim como genes adipogênicos foram determinados durante a fase de diferenciação. Ainda, investigou-se a participação da rSAA no metabolismo da glicose, bem como a expressão do seu receptor GLUT4 e os perfis de lipólise. Como resultados, obteve-se que a rSAA causou um aumento na proliferação celular assim como na porcentagem de células na fase S. Este efeito foi dose dependente e mediado via sinalização da ERK1/2. Ainda, a rSAA inibiu a diferenciação por meio da diminuição da expressão de fatores de transcrição (PPAR γ , C/EBP β e C/EBP α) e proteínas adipogênicas (FABP4 e perilipina). Em relação à captação de 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose, a rSAA preveniu este processo, corroborando com os resultados de expressão diminuída do receptor GLUT4. Ainda, o aumento da lipólise provocada pela rSAA, favorece a resistência à insulina no modelo estudado. Portanto, conclui-se que a SAA aumenta a proliferação mas inibe a diferenciação de células 3T3-L1 sugerindo um papel importante desta proteína no processo de adipogênese.

Palavras-chave: SAA, adipogênese, inflamação, resistência à insulina, obesidade.

Considering that SAA is an acute phase protein and increased serum levels are associated with chronic hyperglycemia, insulin resistance and obesity, we first examined the possibility that rSAA could affect proliferation and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with recombinant human SAA and [methyl-³H]-thymidine incorporation, flow cytometric analysis of cell cycle and viability were performed. Also, gene expression profiles of adipogenic factor were performed during differentiation protocol as well as glucose uptake, GLUT4 gene expression and lipolysis assay. rSAA caused an increment in cell proliferation consisted with FACS analysis with a percentage of cells in the S phase. Cell proliferation was mediated by ERK1/2 signaling pathway and in a dose-dependent manner. Also, SAA inhibited differentiation process by decreasing adipogenic genes PPAR γ , C/EBP β , C/EBP α , and proteins FABP4, and perilipin expression. Also, rSAA prevented 2-deoxy-[1,2-³H]-glucose uptake and GLUT4 expression. In addition, lipolysis was increased favoring insulin resistance in 3T3-L1 adipogenic model. In conclusion, it was demonstrated that rSAA enhances proliferation but prevents differentiation in 3T3-L1 adipocytes, supporting a even more complex participation, than previously expected, of inflammatory proteins in the adipogenic process.

Keywords: SAA, adipogenesis, inflammation, insulin resistance, obesity.

A obesidade é uma doença que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura subcutânea e visceral. Sua gravidade pode ser medida por suas complicações como dislipidemia e doenças cardiovasculares, Diabetes mellitus tipo 2, certos tipos de câncer, dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor (Laake, Thune *et al.*, 2010; Leitzmann, Brenner *et al.*, 2010; Samolis, Papastefanou *et al.*, 2010). Atualmente, a obesidade é um grave problema de saúde pública nos países desenvolvidos e um crescente problema nos países em desenvolvimento (Bornstein, Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2008; Melnyk, Small *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos anos, a resposta inflamatória tem sido exaustivamente associada ao ganho de peso, às complicações relacionadas à resistência à insulina e ao risco cardiovascular (Ross, 1999) (Bastard, Maachi *et al.*, 2006; Yang, Lee *et al.*, 2006; Faintuch, Marques *et al.*, 2008; Sjöholm, Lundgren *et al.*, 2009). Além disso, a inflamação tem sido proposta como elo entre a obesidade e as demais complicações (Yang, Lee *et al.*, 2006). Os ensaios bioquímicos utilizados na detecção desta resposta, geralmente crônica e branda, focam na detecção plasmática da proteína C reativa (PCR) e na amiloide sérica A (SAA). Ambas as proteínas são liberadas pelo fígado durante a fase aguda e são indicativos dos vários estágios da doença inflamatória.

A descoberta de que a SAA era também expressa em adipócitos (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005) fez surgir uma variedade de hipóteses a respeito da regulação e do envolvimento desta proteína nos processos que envolviam a

hiperplasia e a hipertrofia do tecido adiposo. O aumento do tamanho do adipócito foi relacionado ao aumento da secreção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (Hotamisligil, Arner *et al.*, 1995; Spiegelman, Arner *et al.*, 1995) (Lehrke e Lazar, 2004). Posteriormente foi demonstrado que a SAA apresentava-se elevada no soro de pacientes obesos, se comparado a indivíduos saudáveis, e que a expressão do mRNA da SAA correlacionava-se com o IMC e o tamanho do adipócito (Yang, Lee *et al.*, 2006).

Com o intuito de ampliarmos o quadro de efeitos biológicos da SAA sobre o tecido adiposo, propusemos reconhecer novas atividades biológicas desta proteína sobre pré-adipócitos murinos nos processos que envolvem a aquisição (proliferação e diferenciação) do tecido adiposo.

5.1 Amilóide sérica A (SAA)

As SAAs são apolipoproteínas de 12 kDa altamente conservadas entre as espécies. Esta família consiste de 4 genes que se encontram no cromossomo 11 em humanos (Steel, Sellar *et al.*, 1993). A SAA de fase aguda consiste de duas isoformas, a SAA1 e a SAA2, cuja expressão e síntese são induzidas em resposta ao estímulo pró-inflamatório (Jensen e Whitehead, 1998). A resposta aguda gera uma seqüência de reações inflamatórias que contribuem para a proteção do hospedeiro por conta de danos teciduais, infecções ou trauma. Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de SAA é menor que 1 µg/mL, podendo aumentar 1000 vezes em 24 horas em resposta a algum dano tecidual ou infecção (Gabay e Kushner, 1999). Concentrações permanentemente altas são observadas em situações de doença crônica como o Diabetes mellitus (Kumon, Suehiro *et al.*, 1994), artrite reumatóide (Hilliquin, 1995), câncer (Biran, Friedman *et al.*, 1986) e aterosclerose (Fyfe, Rothenberg *et al.*, 1997). Os outros dois membros da família das SAAs são a SAA3 e a SAA4. A SAA3 é expressa em glândulas mamárias em resposta à prolactina (Larson, Wei *et al.*, 2003). A SAA4, a única forma glicosilada, é constitutivamente expressa em diversos tecidos e células humanas e sua resposta frente a um estímulo pró-inflamatório é considerada moderada. Ainda, a SAA4 representa cerca de 90% do total da SAA em situações de homeostase (Steel, Sellar *et al.*, 1993).

Apesar de a SAA ter sido seqüenciada em várias espécies, não há um número considerável de estudos referentes à sua estrutura. Sabe-se, entretanto, que apresenta uma região α -hélice amino terminal, o que permite sua ligação com a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). Além da associação da SAA com a HDL ser uma forma de transporte plasmático, acredita-se que esta ligação seja importante para manter a SAA inativa durante o seu transporte. A SAA dissociada da HDL atua como um potente estímulo para as células inflamatórias (Furlaneto, Ribeiro *et al.*, 2002), caracterizando a HDL como um transportador seguro da SAA para sítios específicos.

A SAA de fase aguda é produzida pelo fígado em resposta ao evento inflamatório (Gabay e Kushner, 1999). Os hepatócitos produzem a SAA a partir de estímulos de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (Steel, Sellar *et al.*, 1993; Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). A meia-vida da SAA no plasma é de cerca de 1 dia (Urieli-Shoval *et al.* 2000), sendo que seu catabolismo acontece também no fígado. A capacidade do fígado em degradar a SAA durante a fase aguda é diminuída, ou mesmo anulada, o que mantém as altas concentrações da proteína no plasma de indivíduos nesta situação (Gollaher e Bausserman, 1990).

A SAA também é sintetizada em tecidos extra-hepáticos e células como monócitos/macrófagos, células endoteliais e células do músculo liso (Urieli-Shoval, Linke *et al.*, 2000). Adipócitos humanos também expressam e secretam SAA, caracterizando o tecido adiposo como uma importante fonte desta proteína além do fígado (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005).

A SAA livre é encontrada somente em tecidos inflamados, sugerindo um papel importante de resposta inflamatória localizada (O'hara, Murphy *et al.*, 2000). Tendo esta informação como base, diversos trabalhos sugerem diferentes tipos de receptores para a SAA: (i) o FPR2 (*formyl-peptide receptor 2*), um receptor transmembrana associado à proteína Gi, sensível a toxina pertussis (He, Sang *et al.*, 2003); (ii) o CD 36, receptor *scavenger* de HDL expresso por monócitos/macrófagos (Baranova, Vishnyakova *et al.*, 2005; Cai, De Beer *et al.*, 2005); (iii) o RAGE, receptor multiligante encontrado em células mononucleares (Cai, Song *et al.*, 2007); (iv) *Tanis* (ou selenoproteína S) um receptor expresso pelo fígado e regulado por concentrações de glicose (Walder, Kantham *et al.*, 2002) e (v) receptores *Toll-like 2* (TLR2) (He, Zhou *et al.*, 2009) e 4 (TLR4) (Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008). A Tabela 1 lista outros receptores e proteínas ligantes da SAA.

Tabela 1. Receptores e proteínas ligantes para a SAA

Moléculas ligantes e receptores para a SAA		Referência	rSAA [†]
SELS	Homeostase da glicose, estresse de RE	(Walder, Kantham <i>et al.</i> , 2002)	Não
ABCA1	Efluxo de colesterol	(Abe-Dohmae, Kumon <i>et al.</i> , 2006)	Sim
ABCA7	Efluxo de colesterol	(Abe-Dohmae, Kumon <i>et al.</i> , 2006)	Sim
SR-BI	Sinalização inflamatória	(Van Der Westhuyzen, Cai <i>et al.</i> , 2005)	Sim
CD36	Sinalização inflamatória	(Baranova, Vishnyakova <i>et al.</i> , 2005)	Sim
TLR2	Sinalização inflamatória	(He, Zhou <i>et al.</i> , 2009)	Sim
TLR4	Sinalização inflamatória	(Sandri, Rodriguez <i>et al.</i> , 2008)	Sim
CST3	Sinalização inflamatória	(Bokarewa, Abrahamson <i>et al.</i> , 2007)	Sim
FPR2	Quimiotaxia, ativação imune	(Dufton, Hannon <i>et al.</i> , 2010)	Sim
RAGE	Células mononucleares	(Yan, Zhu <i>et al.</i> , 2000)	Sim
OmpA	Opsonização	(Shah, Hari-Dass <i>et al.</i> , 2006)	Sim

[†] Trabalhos que utilizaram a proteína recombinante SAA (rSAA). SELS, Selenoproteína S; ABCA1, ATP-binding cassette, subfamília A (ABC1), membro 1; ABCA7, ATP-binding cassette, subfamília A (ABC1), membro 7, SR-BI, receptor *scavenger* classe B, membro 1; CD36, receptor

.scavenger CD36; TLR2, receptor *toll-like* tipo2; TLR4, receptor *toll-like* tipo 4, CST3, cistatina C; FPR2; receptor *formyl peptide* 2; RAGE, receptor de produtos de glicação; OmpA, *outer membrane protein A*, RE, retículo endoplasmático.

Diante dos efeitos biológicos da SAA no foco inflamatório e da perspectiva de elucidar estes efeitos sobre células do sistema imune, nosso grupo de pesquisa descreveu, nos últimos anos, atividades biológicas da SAA que promoveram aumento da expressão de mRNA de citocinas importantes da resposta inflamatória, bem como um aumento na sua liberação, como TNF- α , IL-1 β , IL-1ra e IL-8 (Furlaneto e Campa, 2000; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004). Ainda, a SAA induziu a produção de óxido nítrico (NO) em células monocíticas. (Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008) e neutrófilos e monócitos de indivíduos diabéticos respondiam mais eficientemente à SAA aumentando tanto a produção de citocinas como a migração destas células (Hatanaka, Monteagudo *et al.*, 2007).

Em linhagens celulares de gliomas, a SAA promoveu maior proliferação, migração e invasão celulares, bem como induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da síntese e atividade de metaloproteinases (MMPs), sugerindo um papel relevante da SAA na progressão tumoral (Knebel, 2010).

A Figura 1 resume as principais atividades biológicas descritas pelo grupo.

Figura 1. Atividades biológicas da SAA relacionadas com as células do sistema imune e modelo de células tumorais. Nos trabalhos, foi utilizada a rSAA humana (Pepro Tech Inc, Rocky Hill, NJ). Interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 1β (IL-1β), 1 ra (IL-1ra) e 8 (IL-8); fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); óxido nítrico (NO); espécies reativas de oxigênio (ROS). (Furlaneto e Campa, 2000; Furlaneto, Ribeiro *et al.*, 2002; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004; Sandri, Rodriguez *et al.*, 2008; Knebel, 2010)

5.2 O tecido adiposo e a inflamação

Em mamíferos existem dois tipos distintos de gordura, o tecido adiposo branco (TAB) e o marrom (TAM). O primeiro é predominante e responsável por armazenar lipídeos em situação de alta disponibilidade de nutrientes, enquanto

que o segundo gera calor via oxidação lipídica. Além das habilidades inatas do TAB que compreendem a lipólise e a lipogênese, é um órgão com características endócrinas que secretam inúmeros hormônios, conhecidos como adipocinas e estão envolvidos na regulação metabólica. Em termos de localização, os dois tipos teciduais encontram-se nos mesmos locais, conceituando o tecido adiposo como órgão (Cinti, 2009; Seale, Kajimura *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da obesidade é caracterizado pelo aumento no número de células do tecido adiposo (hiperplasia) e acúmulo de lipídeos intracelulares (hipertrofia), resultado da proliferação e diferenciação celular. Estes processos são regulados por fatores endócrinos, genéticos, metabólicos, neurológicos, ambientais e nutricionais (Kopelman e Albon, 1997; Kopelman, 1999). Apesar da capacidade dos pré-adipócitos em proliferarem, o número de adipócitos no tecido permanece constante, pois assim como pré-adipócitos são recrutados para tornarem-se células maduras, adipócitos maduros, que não são capazes de proliferarem, sofrem apoptose na mesma proporção (Arner e Spalding, 2010).

Apesar dos mecanismos celulares e moleculares que associam o aumento do tecido adiposo com complicações como a síndrome metabólica e a disfunção cardiovascular não estarem bem elucidados, esta associação é bem documentada clínica e epidemiologicamente (Gomez-Ambrosi, Azcona *et al.*, 2008; Jylhava, Haarala *et al.*, 2009). Segundo Yang e colaboradores (Yang, Lee *et al.*, 2006), a SAA derivada do tecido adiposo (tanto a proteína como a sua expressão gênica), foi associada com o IMC dos indivíduos e com o tamanho do adipócito.

Diante do cenário de resposta inflamatória associada à hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo e o recrutamento de macrófagos para o mesmo, diversas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na patogênese da obesidade, caracterizado principalmente por um estado de inflamação crônica. Em animais obesos, a expressão de TNF- α e SAA estão aumentadas levando à resistência à insulina e à síndrome metabólica. Ainda, a secreção de SAA pelo tecido adiposo de humanos apresenta-se aumentada em condições de hipertrofia (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005; Poitou, Coussieu *et al.*, 2006; Yang, Lee *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante é o metabolismo do tecido adiposo. A lipólise aumentada está associada ao processo inflamatório. Estudos com camundongos *knockout* para a perilipina, uma proteína que reveste os triacilgliceróis intracelulares, mostraram que a ausência desta promove aumento da lipólise basal sugerindo que esta facilita o processo não só como barreira funcional mas também facilitando a ação enzimática das lipases citoplasmáticas. Ainda, adipócitos isolados destes animais tratados com agonistas β -adrenérgicos não foram capazes de maximizar a liberação de ácidos graxos e glicerol, sugerindo que a perilipina controla a lipólise estimulada pelo hormônio (Martinez-Botas, Anderson *et al.*, 2000; Tansey, Szalay *et al.*, 2001).

Em estudo mais recente, Miyoshi e colaboradores (Miyoshi, Souza *et al.*, 2009; Miyoshi, Souza *et al.*, 2010) demonstraram que animais com superexpressão de perilipina estavam protegidos contra a hipertrofia de adipócitos, obesidade e resistência à insulina quando submetidos à dieta rica em gordura. Ainda, um estudo realizado por Souza e colaboradores (Souza, De

Vargas *et al.*, 1998) mostrou que a perilipina A e B controlam a hidrólise de triacilgliceróis intracelulares e que estas estavam localizadas na superfície do conteúdo lipídico intracelular. Ainda, os autores constataram que o TNF- α promovia uma redução da expressão das perilipinas.

Além dos adipócitos, outras células podem contribuir com a produção de mediadores inflamatórios no tecido adiposo (Rocha e Libby, 2008). Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado uma participação efetiva dos macrófagos nos aspectos inflamatórios da obesidade (Weisberg, Mccann *et al.*, 2003). Os fagócitos mononucleares no tecido adiposo apresentam uma grande heterogeneidade, onde macrófagos infiltrados e residentes coexistem contribuindo para a manutenção da homeostase (Lumeng, Bodzin *et al.*, 2007). Considerando que os macrófagos residentes, tipo predominante no tecido adiposo magro, apresentam marcadores de ativação alternativa (M2) como a arginase, os macrófagos infiltrados, presentes em grande número no tecido adiposo hipertrofiado, apresentam marcadores de ativação clássica (M1), ou seja, expressão elevada de IL-6 e óxido nítrico sintase 2 (Gordon, 2007).

A relevância dos macrófagos no desenvolvimento de complicações metabólicas na obesidade está relacionada com a migração desses fagócitos para o tecido. Nesse contexto, há estudos mostrando a importância de mediadores inflamatórios como a MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e seu receptor CCR2, evidenciando uma diminuição na infiltração de macrófagos (M1) no tecido adiposo em animais deficientes de CCR2 (Kandà, Tateya *et al.*, 2006; Weisberg, Hunter *et al.*, 2006). Entretanto, outras publicações importantes, não observaram influência do MCP-1 e CCR2 na infiltração de macrófagos no tecido adiposo ou na resistência insulínica (Inouye, Shi *et al.*, 2007; Kirk, Sagawa

et al., 2008), sugerindo que existam outros mecanismos que contribuem para a migração de macrófagos para o tecido adiposo.

Figura 2. Infiltração de macrófagos no tecido adiposo humano. Segundo (Lumeng, Bodzin et al., 2007), macrófagos residentes (M1) e infiltrados (M2) coexistem no tecido adiposo hipertrofiado. *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1); receptor da MCP-1 (CCR2). Adaptado de (Rocha e Libby, 2009)).

5.3 Modelo de adipogênese – pré-adipócitos 3T3-L1

Os estudos sobre o processo de proliferação e diferenciação do tecido adiposo, fenômeno denominado de adipogênese, têm sido extensivamente realizados *in vitro*, com o intuito de elucidar a base molecular e celular do seu desenvolvimento e o seu comprometimento em estados patológicos.

As células da linhagem 3T3-L1 têm sido úteis como modelo de adipogênese (Green e Kehinde, 1975; Xia e Serrero, 1999; Tang, Otto *et al.*, 2003; Harrington, Pond-Tor *et al.*, 2007; Lee, Lee *et al.*, 2009; Xing, Yan *et al.*, 2010) e os processos de proliferação e diferenciação de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 serão descritos a seguir, assim como os agentes estimuladores de cada etapa e as vias de sinalização envolvidas em cada processo.

5.3.1 Proliferação de células 3T3-L1

A insulina é, reconhecidamente, o principal componente estimulador da mitogênese e adipogênese de células adiposas (Green e Kehinde, 1975). Para exercer suas inúmeras ações, ela emprega duas vias metabólicas distintas: a via da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), que é responsável pela maioria das ações metabólicas do hormônio e a via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) que regula a expressão de vários genes e controla a proliferação e diferenciação celulares (Grammer e Blenis, 1997; Gagnon, Dods *et al.*, 2001). Sabe-se ainda que pré-adipócitos não possuem receptores de insulina de forma expressiva (Madoff, Martensen *et al.*, 1988; Smith, Wise *et al.*, 1988), sendo que esta última promove suas ações proliferativas mediadas pelo receptor do *insulin like growth factor 1* (IGF-1), o IGF-1R, um receptor tipo tirosina quinase (Green e Kehinde, 1975; Smith, Wise *et al.*, 1988).

A insulina, ao se ligar à subunidade α de seu receptor tetramérico, dá início a uma série de ações imediatas e tardias, metabólicas e promotoras de crescimento. Tais eventos ocorrem por meio da estimulação da subunidade β

transmembranar do receptor, que autofosforila e ativa a fosforilação de substratos endógenos intracelulares, conhecidos como substratos do receptor de insulina (IRS). Os principais substratos são o IRS-1 e IRS-2 e a fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2) como a PI3K (Cheatham, Vlahos *et al.*, 1994; Virkamaki, Ueki *et al.*, 1999).

Entretanto, o receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal pela diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina, fenômeno associado a obesidade e a resistência à insulina (Hotamisligil, Peraldi *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que a ativação da PI3K é essencial para diversos efeitos metabólicos da insulina, os quais foram abolidos quando a ativação desta foi impedida farmacologicamente pela wortmanina. Entre estes efeitos biológicos estão a captação de glicose, a translocação das vesículas do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, a ativação da lipogênese e da síntese de glicogênio e inevitavelmente a ação mitogênica relacionada à sobrevivência celular (Cheatham, Vlahos *et al.*, 1994; Clarke, Young *et al.*, 1994; Virkamaki, Ueki *et al.*, 1999). A ativação da via da PI3K induzida pela insulina pode ser bloqueada pela wortmanina, como descrito anteriormente. Esta última, um metabólito fúngico com potente atividade antiinflamatória, é inibidor seletivo da PI3K (Clarke, Young *et al.*, 1994; Tomiyama, Nakata *et al.*, 1995; Tomiyama, Nishio *et al.*, 1999).

Os efeitos mitogênicos da insulina também dependem de outra via, a das MAPK (Benito, Valverde *et al.*, 1996; Hajduch, Litherland *et al.*, 2001). As MAPKs são serina-treonina quinases responsáveis por sinais regulatórios na célula. Seu sinal inicial, em geral, é derivado de estímulos que regulam a produção de citocinas e fatores de crescimento (Bost, Aouadi *et al.*, 2005). A via das MAPKs e suas implicações no processo de adipogênese serão descritos no item *Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1*.

Alguns outros agentes proliferativos foram descritos para pré-adipócitos 3T3-L1. Em experimento utilizando a técnica de incorporação de [metil-³H]-timidina ao DNA, Stewart, Guan e Yang (Stewart, Guan *et al.*, 2010) observaram que a *bone morphogenetic protein 3* (BMP-3), uma proteína óssea com potente ação anti-osteogênica, promoveu um aumento da proliferação de pré-adipócitos em cerca de 3 vezes em relação às culturas controle. Ainda neste trabalho, os autores testaram o efeito mitogênico da BMP-3 em uma linhagem de células mesenquimais murinas (C3H10T1/2), onde concluíram que a proteína também exercia efeito mitogênico em células com menor grau de comprometimento com a linhagem adipogênica. Outro trabalho testando a hipótese de agente mitogênico de um fator de crescimento, o *keratinocyte growth factor* (KGF), demonstrou que o tratamento de pré-adipócitos subconfluentes aumentou consideravelmente a incorporação de [metil-³H]-timidina ao DNA, caracterizando-se como um fenômeno dose-dependente (Zhang, Guan *et al.*, 2010).

5.3.2 Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado. Durante a fase de proliferação, os pré-adipócitos são morfológicamente similares a fibroblastos. Na confluência, a indução da diferenciação com tratamento hormonal apropriado, leva a uma significativa alteração na morfologia celular. O pré-adipócito torna-se esférico, acumula lipídeos em pequenas gotículas e progressivamente adquire características bioquímicas e morfológicas de um adipócito maduro, conforme demonstrado na Figura 3 (Soukas, Socci *et al.*, 2001; Longo, Kennell *et al.*, 2002; Ross, Erickson *et al.*, 2002).

A diferenciação de células confluentes é iniciada pela exposição destas ao coquetel adipogênico contendo isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor de cAMP fosfodiesterase, dexametasona (DEX), que ativa receptores glicocorticóides e insulina, que ativa o receptor IGF-1R. Este coquetel é conhecido como meio de diferenciação (MDI) (Madsen, Petersen *et al.*, 2003; Madsen, Petersen *et al.*, 2005; Petersen, Madsen *et al.*, 2008). O protocolo de diferenciação é ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. (A) Protocolo experimental de diferenciação de pré-adipócitos murinos em adipócitos. (B) Células subconfluentes em meio de propagação. (C) Células confluentes foram estimuladas com MDI por 24 horas. (D) Adipócitos já diferenciados após 8 dias de estímulo e (E) adipócitos diferenciados com corante específicos para lipídeos intracelulares *Oil Red O*. Isobutilmetilxantina (IBMX); dexametasona (DEX);

CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP α), (C/EBP β); peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ).

A diferenciação dessas células compreende estágios precisamente controlados: parada do ciclo celular, expansão clonal (MCE) e diferenciação (eventos iniciais, intermediários e terminais, respectivamente), por meio da ativação de centenas de genes anteriormente silenciosos. A ativação de receptores de glicocorticóides, IGF-1R e a via de sinalização do AMPc, leva à expressão de proteínas *CCAAT/enhancer binding proteins*, o C/EBP- β e o C/EBP- δ . As células, então, reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do ciclo e entram em diferenciação terminal por ativação do receptor nuclear *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) e C/EBP- α , os dois reguladores centrais do processo adipogênico (Figura 4) (Gregoire, Smas *et al.*, 1998; Farmer, 2005; Guo, Zhang *et al.*, 2009).

Figura 4. Expressão gênica de fatores de transcrição e receptores nucleares durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- δ , C/EBP- ζ); peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), meio de diferenciação (MDI) (Farmer, 2005).

Segundo Qiu e colaboradores (Qiu, Wei *et al.*, 2001), a MCE é iniciada pela ativação das proteínas MAPK, mais especificamente a *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2). As MAPKs são uma família de serina/treonina quinases ativadas por fosforilação e coordenam a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos. Elas participam na regulação das atividades celulares de proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celulares. Os mamíferos expressam diversos grupos de MAPKs. Dentre estes grupos, dois importantes se destacam: proteínas quinases reguladas por sinal extracelular ou ERK1/2 e as proteínas quinases ativadas por estresse, como as p38^{MAPK} e JNK (Chen, Gibson *et al.*, 2001).

Mais recentemente, Guo e colaboradores (Guo, Zhang *et al.*, 2009) discutiram o processo de diferenciação de maneira mais simplificada. Os autores sugeriram haver apenas dois estágios no processo de diferenciação: a fase de licenciamento e a fase de execução. A primeira é totalmente dependente do contato entre as células, caracterizando a importância da comunicação entre as mesmas, evidenciado pelo maior número de adipócitos diferenciados quando em maior densidade celular. Além disto, a MCE também foi discutida como um evento independente no processo e, portanto, não essencial. Sendo assim, os autores ainda concluem que a fase de execução é totalmente dependente da fase inicial de células quiescentes, onde os genes adipogênicos seriam expressos.

Outros autores, entretanto, relatam que o MCE é crucial para a diferenciação (Kim, Park *et al.*, 2008; Lee, Lee *et al.*, 2009; Saito, Abe *et al.*, 2009). Durante a adipogênese, os pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes entram, de forma sincronizada, na fase S do ciclo celular e iniciam a MCE (Tang, Otto *et al.*, 2003). Algumas proteínas relacionadas ao crescimento celular são expressas e ativadas nas fases iniciais da diferenciação incluindo as MAPKs ERK1/2 e a p38^{MAPK} (Ko, Shen *et al.*, 2002).

Quando observamos a expressão gênica dos pré-adipócitos 3T3-L1 durante o processo de diferenciação, os diferentes fatores de transcrição envolvidos são expressos nas primeiras horas após o estímulo com MDI. A expressão de C/EBP β é rapidamente induzida em resposta aos indutores adipogênicos (MDI). O C/EBP β é então convertido em sua forma fosforilada pela ERK1/2 (Tang, Gronborg *et al.*, 2005; Li, Kim *et al.*, 2007). A forma ativa do C/EBP β atua como regulador transcricional do PPAR γ e do C/EBP α , que são cruciais para a maturação dos

adipócitos (Rosen, Walkey *et al.*, 2000; Hamm, Park *et al.*, 2001). Alguns dos fatores primários para que a adipogênese aconteça, como os fatores de transcrição C/EBP β , são expressos apenas nas primeiras horas da diferenciação de células 3T3-L1 em adipócitos, mas mesmo assim são essenciais para a indução dos fatores de transcrição tardios na adipogênese, como o PPAR γ e o C/EBP α , como ilustra a Figura 5 (Rosen e Macdougald, 2006).

Figura 5. Papel do C/EBP β na progressão da diferenciação de pré-adipócitos. O C/EBP β regula a expressão e a atividade do PPAR γ , que leva a expressão dos principais genes adipogênicos. *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP- α , C/EBP- β); *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ). Adaptado de (Farmer, 2005).

5.4 Pré-adipócitos 3T3-L1 e SAA

Nos pré-adipócitos 3T3-L1 murinos, a SAA expressa em condições de inflamação é a SAA3. A expressão da SAA3 atinge o pico em três dias após o estímulo com MDI e se mantém constante durante a maturação do adipócito (Fasshauer, Klein *et al.*, 2004).

Segundo Han e colaboradores (Han, Subramanian *et al.*, 2007), a síntese de SAA3 por adipócitos 3T3-L1 apresentou-se aumentada em condição de hipertrofia em culturas com alta concentração de glicose. O mesmo foi observado em modelo de obesidade genético e induzido por dieta hipercalórica. Os autores ainda propuseram que o aumento da produção de SAA3 foi coordenado e reciprocamente regulado pela atividade do fator de transcrição NF κ B e de PPAR γ . Ainda, a SAA3 juntamente com o ácido hialurônico produzido também pelo tecido adiposo murino, formam um complexo que facilita o recrutamento e adesão de monócitos, levando ao fenômeno já conhecido de infiltração de macrófagos no tecido adiposo.

Segundo Carwithorn e colaboradores, a exposição de TNF- α em culturas de 3T3-L1 a inibição da diferenciação. Ainda, baixas concentrações de TNF- α foram usadas nos experimentos, suficiente para inibir a diferenciação, mas não para promover a apoptose, característica já conhecida desta citocina. Guilherme e colaboradores relataram que o TNF- α prejudicava indiscutivelmente a aquisição de lipídeos neutros no tecido adiposo e conseqüentemente diminuía, em outros tecidos, a sensibilidade à insulina. Ainda, o mecanismo pelo qual esta citocina promovia tal efeito era baseado em experimentos relacionados à atividade do PPAR γ . Paralelamente a estes trabalhos, nosso grupo tem relatado nos últimos anos a capacidade da SAA recombinante (rSAA) de induzir a expressão e síntese

de TNF- α em diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos (Furlaneto e Campa, 2000; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004) monócitos (Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003) e leucócitos de pacientes diabéticos (Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004).

O objetivo geral deste trabalho foi reconhecer novas atividades biológicas da SAA nos processos de proliferação, diferenciação e metabolismo do tecido adiposo utilizando o modelo murino 3T3-L1.

Diante disto, os nossos objetivos específicos foram:

- (i) Determinar o efeito da rSAA na proliferação de células 3T3-L1, assim como avaliar a viabilidade e morte;
- (ii) Avaliar o efeito da presença dos inibidores da ERK1/2, da p38, de PI3K e dos receptores acoplados a proteína Gi na proliferação de células 3T3-L1 estimuladas com rSAA;
- (iii) Determinar o efeito da rSAA no processo de diferenciação de células 3T3-L1;
- (iv) Avaliar o efeito da rSAA no metabolismo da glicose e nos processos de lipólise de adipócitos 3T3-L1.

7.1 Reagentes

A proteína recombinante humana SAA (rSAA) foi adquirida da Peprotech Inc (Rocky Hill, NJ), lotes 110766 e 090766. Os reagentes Anexina –FITC (AFITC), toxina pertussis, insulina bovina, IBMX, DEX, iodeto de propídio (PI), *Trypan Blue*, HEPES - NaOH, ácido tricloroacético (TCA), *Oil Red O*, floretina e *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMFS) foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO). *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM), *calf serum* (CS), penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, Calif). Os radioisótopos [metil-³H]-Timidina e 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose foram adquiridos da Amersham (GE Healthcare, USA). Da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha) foram adquiridos NaOH, acetona, citrato de sódio, Triton X-100, formaldeído, metanol, isopropanol, NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂ e KH₂PO₄. Os inibidores wortmanina, PD98059 e SB203580 foram obtidos da Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA). Por fim, a solução cintiladora foi adquirida da PerkinElmer (Boston, USA).

7.2 Células e condições de cultura

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram doados pela Prof^a Mari Cleide Sogayar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em atmosfera

de 5% de CO₂ a 37°C em meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose, suplementado com 10% de soro CS, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O meio foi trocado a cada 48 horas e todos os experimentos foram realizados entre as passagens 4 e 8.

Para a diferenciação em adipócitos, células confluentes foram estimuladas a se diferenciarem mediante o tratamento com meio de diferenciação (MDI) composto por 0,5mM de IBMX, 1µM de DEX e 1,67 µM de insulina em DMEM suplementado com 10% SFB. Após 72 horas, o meio foi trocado para DMEM contendo somente 10% SFB e 1,67 µM de insulina e trocado a cada dois dias por 8 dias.

7.3 Proliferação celular pela incorporação de [metil-³H]-Timidina ao DNA

As células foram plaqueadas na densidade de $1,0 \times 10^4$ cel/mL em placas de cultura de 96 poços com DMEM contendo 10% de CS. Quando as células atingiram 70% de confluência, foram carenciadas com DMEM a 1% de CS por 48 horas. Após este período, as células foram tratadas com rSAA nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 0,5 µCi de [metil-³H]-Timidina em cada poço. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C e após este período foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 por quatro vezes a fim de remover a timidina radioativa não incorporada. Em seguida foi adicionado solução de TCA 10% por 15 minutos para que, subsequentemente, as células fossem lisadas com 20 µL de NaOH 0,4 N aquecido a 62°C. O lisado celular foi recuperado das placas por meio de papel filtro de alta absorção (0,5

cm²) (Whatman®) e submetidos à leitura da radioatividade em cintilador líquido (Beckman Scintillation Counter) com 2 ml de solução cintiladora contendo 4g PPO (2,5-difeniloxazol) e 0,1g POPOP ((1,4-di 2,5-feniloxazoil) benzeno) em tolueno.

7.4 Avaliação do ciclo celular

As células foram plaqueadas (1×10^4 cel/mL) com meio DMEM com 10% de CS em placa de 24 poços. Após as células atingirem 70% de confluência, o meio foi retirado e substituído por DMEM com 1% CS. Após 48 horas, as células foram tratadas com rSAA nas concentrações de 1 e 5 µg/mL por 24 e 48 horas. Após a incubação, as células foram lisadas com tampão contendo citrato de sódio 0,1%, Triton X-100 0,1% e PI 2 µg/mL. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto® (Becton Dickinson) e os histogramas analisados pelo *software* FlowJo® e Diva®.

7.5 Necrose e apoptose

As células foram plaqueadas (1×10^4 cel/mL) com meio DMEM com 10% de CS em placa de 24 poços. Após as células atingirem 70% de confluência, o meio foi retirado e substituído por DMEM com 1% CS. Após 48 horas, o meio foi removido e as células foram tratadas com rSAA nas concentrações de 1 e 5 µg/mL por 24 horas. Após a incubação, as células foram marcadas com Anexina V conjugada com um fluorocromo FITC (1:500) e PI (2 µg/mL). As amostras foram

analisada em citômetro de fluxo FACSCanto® (Becton Dickinson®) e os histogramas analisados pelo *software* FlowJo® e Diva®.

7.6 Vias de sinalização na proliferação celular pela incorporação de [metil-³H]-Timidina ao DNA

As células foram plaqueadas na densidade de $1,0 \times 10^4$ cel/mL em placas de cultura de 96 poços com DMEM contendo 10% de CS. Quando as células atingiram 70% de confluência, foram carenciadas com DMEM a 1% de CS por 48 horas. Após este período, as células foram expostas aos inibidores das vias ERK1/2 (PD98059), p38^{MAPK} (SB203580), PI3K (Wortmanina) e do receptor acoplado a proteína Gi (Toxina pertussis) nas concentrações de 10 μ M, 10 μ M, 100 nM e 100 ng/mL, respectivamente, seguido de tratamento com rSAA nas concentrações de 1, 5 e 10 μ g/mL por 24 horas. O processamento das amostras para a determinação da radioatividade foi conduzido conforme descrito no item 9.3.

As concentrações dos inibidores utilizadas para este experimento foram pré-determinadas por ensaio de viabilidade celular a partir da avaliação da integridade de membrana e fragmentação do DNA utilizando PI (2 μ g/mL) e citrato de sódio 0,1%, Triton X-100 0,1% e PI 2 μ g/mL, respectivamente. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) e os histogramas analisados pelo *software* CellQuest®. Foram admitidas condições abaixo de 2% necrose e 5% de apoptose.

7.7 Determinação do triacilglicerol intracelular

As células diferenciadas conforme item 9.2, foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 a 37° C e fixadas com formalina (10% de formaldeído e 90% de PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada por 4 vezes e coradas com solução de *Oil Red O* (5 mg/ml em isopropanol:água, 2:1) por 30 minutos. Após este período as células foram lavadas com água e analisadas em Microscópio de luz invertido (Olympus). Após a análise microscópica, o conteúdo de corante intracelular foi dissolvido em metanol e submetido à leitura em espectrofotômetro a 490 nm (Biotek® Microplate Reader).

7.8 Expansão clonal mitótica (MCE)

As células 3T3-L1 foram mantidas em DMEM contendo 10% de CS até atingirem a confluência em placas de 96 poços. O meio foi trocado e mantido por 48 horas. Após este período, as células foram estimuladas com MDI, MDI contendo 5 µg/mL de rSAA, DMEM ou DMEM com 5 µg/mL de rSAA. A cada 24 horas, as células foram contadas em hemocitômetro por método de exclusão utilizando corante *Trypan Blue*. Também foi determinada a incorporação de [metil-³H]-Timidina ao DNA conforme condições acima citadas adicionando-se 0,5 µCi por poço. As amostras foram processadas conforme descrito no item 9.3. Ainda

nas mesmas condições, o ciclo celular foi avaliado nos períodos de 12, 18 e 24 horas conforme descrito no item 9.4.

7.9 Determinação do glicerol

As células 3T3-L1 foram diferenciadas conforme item 9.2 e período e condições pré-determinados, a liberação de glicerol no sobrenadante da cultura foi determinada. A concentração do glicerol foi determinada por meio de curva de calibração utilizando padrão de glicerol (2,5 mg/mL, Sigma) a partir do *kit* colorimétrico enzimático (Sigma) submetendo as amostras à leitura em espectrofotômetro (Biotek® Microplate Reader), em comprimento de onda de 540 nm.

7.10 Expressão gênica na diferenciação celular

Os pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes foram assim mantidos por 48 horas e submetidos à diferenciação com MDI ou MDI contendo 5 µg/mL de rSAA. A extração do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA) foram realizados em 24, 48 e 72 horas após o estímulo inicial.

7.11 Extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA total das células foi realizada pelo *Kit Rneasy®* (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil, São Paulo), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. Durante o procedimento, as amostras foram tratadas com DNase I. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro *NanoDrop®* (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a 260 nm e sua pureza avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm.

7.12 Reação da transcriptase reversa (RT)

As amostras de RNA foram diluídas a síntese do DNA complementar (cDNA) por meio da reação da transcriptase reversa (RT) utilizando o Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ (*Invitrogen*, Carlsbad, Calif.) e o *kit* SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen*, Carlsbad, Calif.). Em um microtubo de 0,2 ml o volume de RNA correspondente à concentração de 600 ng foi acrescido de 1 µl de Oligo dT, 1 µl de *Annealing Buffer* e água-DEPC até o volume final de 10 µl. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 1 minuto, onde foram acrescentados 7 µl do *mix* da Reação *First-Strand* e 1 µl da enzima transcriptase reversa (SuperScript® II RT). A reação foi incubada a 42°C por 50 minutos, seguido por 70°C por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 1 µL de RNase H e a mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos. Assim foi obtido um volume final de 20 µl de cDNA armazenado a -20°C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as incubações foram realizadas em termociclador (*GeneAmp PCR Systems*, Applied Biosystems).

7.13 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

7.13.1 Sistema de detecção SYBR® Green

Foram quantificadas a expressão de mRNA dos genes C/EBP α e β , PPAR γ 1 e 2, da proteína *fatty acid binding protein 4* (FABP4), da perilipina e do GLUT4 por meio do método de qPCR. Para a reação, os cDNAs foram diluídos na concentração de 1ng/ μ L. As reações foram realizadas com volume final de 12 μ L, contendo 3 μ L da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) de cada gene (na concentração de 600 nM), 3 μ L de cDNA e 6 μ L de SYBR®-Green (Universal PCR Master Mix). As reações foram conduzidas separadamente com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador (ABI Prism® 7500 Sequence Detection System Applied Biosystem, New Jersey, EUA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos *primers* a 60 °C por 1 minuto. Para todos os experimentos foi utilizado *threshold* de 0.1 e realizada triplicata das amostras com duplicata de poços.

Tabela 2. Oligonucleotídeos¹ utilizados na reação de qPCR

Genes	Forward	Reverse
18 S	5'GTAACCCGTTGAACCCCAT3'	5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'
PPAR γ 1	5'TTCTGACAGGACTGTGTGACAG3'	5'ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC3'
PPAR γ 2	5'CACAGAGATGCCATTCTGGC3'	5'GGCCTGTTGTAGAGCTGGGT3'
Perilipina	5'CATGTCCCTATCCGATGCC3'	5'TCGGTTTTGTCTCCAGG3'
C/EBP α	5'GTGTGCACGTCTATGCTAAACCA3',	5'GCCGTTAGTGAAGAGTCTCAGTTTG3'
C/EBP β	5'GTTTCGGGACTTGATGCAATC3'	5'AACAACCCCGCAGGAACAT3'
FABP4	5'CCAATGAGCAAGTGGCAAGA3'	5'GATGCCAGGCTCCAGGATAG3'
GLUT4	5'GCTGTGCCATCTTGATGACGG3'	5'TGAAGAAGCCAAGCAGGAGGAC3'

¹ As sequências de oligonucleotídeos foram escolhidas com o auxílio do *software* Primer3 (Untergasser, Nijveen *et al.*, 2007) a partir das sequências gênicas disponíveis no banco de genes do NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov).

A eficiência das reações foi determinada de acordo com a inclinação da curva padrão do Log das diluições do cDNA *versus* a variação entre o ciclo de *threshold* (Ct) do gene alvo e do gene constitutivo (Δ Ct), parâmetros fornecidos pelo *software* 7500 Fast System SDS (Applied Biosystem). O valor, em módulo, da inclinação da reta (*slope*) deve ser próximo de zero para que se admita que as eficiências de amplificação dos genes alvo e do gene constitutivo são similares. A partir destes critérios, pode-se utilizar o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008).

7.13.2 Sistema de amplificação *TaqMan*®

A expressão do gene da SAA3 foi realizada por meio do sistema *TaqMan* (Applied Biosystem, Warrington, UK). Foi utilizado o gene da β -actina como referência constitutiva. Para tanto, os cDNAs foram diluídos na concentração de 9 ng/ μ L e as reações foram realizadas com volume final de 10 μ L, contendo 0,5 μ L

da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com a sonda FAM-NFQ, 4,5 µL de cDNA e 5 µL de *2XTaqman® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystem, Warrington, UK). Para o ensaio, os *primers* utilizados são chamados de inventoriados pelo fabricante (Applied Biosystem, Warrington, UK), que não especificam a sequências nucleotídica, entretanto, garantem a especificidade e funcionalidade do ensaio. As reações foram realizadas em termociclador (ABI Prism® 7500 *Sequence Detection System* Applied Biosystem, New Jersey, EUA) nas seguintes condições: ativação da enzima *AmpErase®UNG* a 50°C por 2 minutos, seguida da desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e elongação dos *primers* e sonda a 60°C por 1 minuto. Para todos os experimentos foram realizadas triplicatas das amostras com duplicata de poços.

7.14 Determinação das citocinas TNF- α , IL-6 e da proteína SAA3

Os pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes foram assim mantidos por 48 horas e submetidos à diferenciação com MDI ou MDI contendo 5 µg/mL de rSAA. As determinações de IL-6 e TNF α foram realizadas no sobrenadante celular coletados em períodos pré-determinados. As análises foram realizadas pelo método de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em placa de poliestireno (Corning), as quais foram montadas e padronizadas a partir do *kit* DuoSet (R&D System Minneapolis, MN, USA), com limite de detecção de 1 pg/mL para ambas as citocinas.

Para a determinação da proteína SAA3 nas condições acima citadas, utilizou-se o conteúdo protéico a partir do lisado celular. As células foram retiradas da placa de cultura e lisadas por irradiação ultrassônica em tampão PBS pH 7,4 contendo 2 mM de PMFS. A determinação da concentração de SAA3 no lisado foi determinada pelo *kit Mouse SAA ELISA Improved* (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) com limite de detecção de 150 ng/mL.

7.15 Captação de 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose

As células 3T3-L1 foram diferenciadas conforme descrito no item 9.2 em placas de 24 poços. Após 8 dias de diferenciação, o MDI foi removido e adicionado DMEM contendo 2,5 g/L de glicose, na ausência de soro e contendo 5 ou 10 µg/mL de rSAA. As células foram mantidas por 18 horas a 37° C. Após este período, o meio foi trocado e adicionado tampão *Krebs–Ringer-Phosphate* (KRH) (25 mM HEPES- NaOH, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1,3 mM KH₂PO₄) contendo ou não 200 nM de insulina e as células foram incubadas a 37° C por 20 minutos. Durante esta incubação, as concentrações de rSAA foram mantidas. Após o período, foi adicionado 1 µCi de 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose por poço e as células foram incubadas por 10 minutos. Após a incubação, as células foram rapidamente resfriadas e lavadas com tampão KRH gelado e adicionado floretina 0,5 mM gelado, a fim de cessar o transporte. As células foram lavadas com PBS e colocadas em *vial*s de cintilação. Ao conteúdo foi adicionado 2 ml de solução cintiladora contendo 4g PPO (2,5-difeniloxazol) e 0,1g POPOP ((1,4-di 2,5-feniloxazoil) benzeno) em tolueno e a radioatividade lida em cintilador líquido (Beckman Scintillation Couter).

7.16 Análise estatística

As médias, erros padrão e as diferenças entre os parâmetros analisados foram determinados pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste de comparação múltipla de Newman Keuls com o software Graphpad Prism4®.

8.1 Proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1

8.1.1 rSAA aumenta a viabilidade de células 3T3-L1

O padrão de distribuição de populações marcadas com PI e AFITC é bastante modificado pela adição da rSAA como mostrado nas Figuras 5A e 5B. Observou-se um aumento do número de células viáveis nas culturas tratadas com rSAA ($83,9 \pm 2,5\%$) se comparadas às culturas controle ($55,5 \pm 9\%$) durante as primeiras 24 horas.

8.1.2 Ação mitogênica da rSAA sobre células 3T3-L1

Diante das informações de que a rSAA aumentava a viabilidade celular de células 3T3-L1, avaliou-se o efeito desta proteína sobre a proliferação de pré-adipócitos a partir da incorporação de [metil- ^3H]-timidina ao DNA. As células subconfluentes foram submetidas a baixas concentrações de CS (1% e 5%), que permaneceram assim por 48 horas. Após o carenciamento de soro, os pré-adipócitos foram tratados com diferentes concentrações de rSAA (1 a 10 $\mu\text{g/mL}$) por 24 e 48 horas.

Figura 5. Determinação da viabilidade celular e morte da 3T3-L1 por citometria de fluxo. Células subconfluentes mantidas em cultura com meio DMEM 1% CS por 24 horas. (A) Histogramas representam as melhores leituras. (B) Valores expressos em percentual de células viáveis (AFITC/PI negativo, branco), células em apoptose (AFITC positivo, preto), células em necrose (PI positivo, cinza) e células em apoptose e necrose (AFITC positivo, PI positivo, cinza claro (3 experimentos independentes, n= 9), (***) e φφφ p <0,001 em relação ao controle).

A Figura 6 mostra o efeito da rSAA sobre a proliferação de 3T3-L1 avaliada pela incorporação de [metil- ^3H]-timidina. Observou-se um aumento de 2,5 vezes na proliferação destas células na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ se comparada à condição controle, caracterizando-se ainda um estímulo dose-dependente. Entretanto, analisaram-se, por microscopia de luz, as culturas por até 48 horas (Figura 6). Nas primeiras 24 horas, observou-se aumento do número de células, condizente com os resultados de proliferação, mas nas 24 horas subseqüentes, foi observado perda da aderência das células (indicado pela seta). Estas observações foram condizentes com dados de 48 horas de incorporação de timidina marcada radioativamente mostrando uma diminuição da incorporação (dados não mostrados).

8.1.3 Ciclo celular de células 3T3-L1 e efeitos da SAA

Os resultados anteriores relacionados ao aumento da proliferação apontam para uma atuação da SAA no ciclo celular demonstrada pelo aumento da incorporação de timidina marcada radioativamente e do aumento da viabilidade após privação de soro. Neste âmbito, foi realizada análise de DNA marcado com PI a fim de evidenciar as células em cada fase do ciclo celular. Como observado na Figura 7, houve uma progressão considerável da fase G1 para a fase S, como observado pela porcentagem de células na fase S tratadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de rSAA ($57,01 \pm 1,8$) e 5 $\mu\text{g/mL}$ de rSAA ($60,96 \pm 0,54$) se comparadas às células controle ($39,82 \pm 2,21$).

Figura 6. Efeito da SAA na proliferação de células 3T3-L1. Células foram mantidas em cultura em DMEM 1% e 5% CS por 24 horas. (A) Incorporação de [metil-³H]-timidina. O valor da radioatividade (cpm/poço) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes ($n = 9$) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Pré-adipócitos 3T3-L1 após incubação de 24 horas, (B) controle, (C) rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ e 48 horas, (D) rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ e 48 horas, (E) rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ e 48 horas.

controle e (D) rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$. Seta em (D) indicando perda da aderência celular (200x).

Figura 7. Diferentes fases do ciclo celular de células 3T3-L1 tratadas com rSAA. As células foram expostas a proteína por 24 horas nas concentrações indicadas com meio DMEM 1% CS. (A) Histogramas ilustrando a intensidade de fluorescência emitida pelo PI (2 $\mu\text{g/mL}$) em 585/42 nm. (B) Porcentagem de

células em cada fase do ciclo. G0/G1, branco, S, cinza, G2/M (cinza escuro). Três experimentos independentes (n= 9), *** e $\phi\phi\phi$ p <0,001 em relação ao controle.

8.1.4 Vias de sinalização celular na proliferação estimulada por rSAA

Para a avaliação das vias de sinalização envolvidas no processo de proliferação estimulada pela rSAA, utilizaram-se alguns inibidores farmacológicos das principais vias de sinalização envolvidas com crescimento e sobrevivência celulares. Para tanto, inicialmente avaliou-se a toxicidade direta destes inibidores sobre os pré-adipócitos 3T3-L1 por meio de análise por citometria de fluxo para a determinação da integridade da membrana celular (necrose) e da fragmentação do DNA (apoptose) (dados não mostrados). A partir de critérios pré-determinados, estabeleceram-se as concentrações máximas para as condições de estímulo da proliferação.

Quando consideramos que a rSAA é um estímulo potente na proliferação de pré-adipócitos, várias vias de sinalização celular podem estar envolvidas. Com relação aos inibidores usados, o inibidor da via ERK1/2, o PD98059, inibiu a ação mitogênica da rSAA consideravelmente (45 %); (p < 0,001), como mostram as Figuras 8. A utilização do inibidor da p38 MAPK, o SB203580, reduziu a proliferação da cultura controle e da cultura estimulada com SAA na mesma proporção. O mesmo foi observado para o inibidor da PI3K, a wortmanina.

Figura 8. Efeito dos inibidores da p38 MAPK (SB203580, 10µM), da ERK1/2 (PD98059, 10µM), da PI3K (wortmanina, 100 nM) na indução da proliferação em células 3T3-L1 pela rSAA. Células foram mantidas em cultura em DMEM 1% de CS por 24 horas. O valor da radioatividade (cpm/poço) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média ± erro padrão de três experimentos independentes (n = 9) (** p <0,01 em relação ao controle, φφφ p <0,001 em relação à rSAA 5 µg/mL).

A insulina, em concentrações farmacológicas (200 nM), se liga aos receptores IGF-1R agindo como fator de crescimento. A Figura 9 mostra o aumento da proliferação de células estimuladas pela insulina, na concentração de 200 nM em diferentes condições. A insulina aumentou consideravelmente a proliferação destas células em 1,4 vezes em relação à situação controle. Ainda, a

adição de rSAA na presença de insulina mostrou ter efeito sinérgico no fenômeno da proliferação (1,3 vezes maior do que o efeito da insulina isoladamente). Adicionalmente, o inibidor da PI3-K, wortmanina, reconhecidamente atuante na sinalização da insulina, preveniu o efeito de ambas as condições, na presença e na ausência de rSAA.

Figura 9. Efeito da insulina na proliferação de células 3T3-L1. Células foram mantidas em cultura em DMEM 1% de CS por 24 horas e pré-adipócitos na presença de insulina 200 nM (preto) e na ausência de insulina (branco) tratados com o inibidor da PI3-K (wortmanina, 100 nM). O valor da radioatividade (cpm/poço) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes (n = 9) (** p < 0,01

em relação ao grupo controle, $p < 0,01$ em relação ao grupo tratado com insulina).

Finalmente, a participação da proteína G (tipo Gi) e, portanto o receptor tipo FPR2 na proliferação estimulada por rSAA foi avaliada pelo tratamento prévio das células com a toxina pertussis (potente inibidor da proteína Gi). Como mostra a Figura 10, a toxina não promoveu alteração na proliferação estimulada pela rSAA.

Figura 10. Toxina Pertussis (*Bordetella pertussis*, 100 ng/mL) na indução da proliferação em células 3T3-L1 pela rSAA. Células foram mantidas em cultura em DMEM 1% de CS por 24 horas. O valor da radioatividade (cpm/poço) da

cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes (n = 9).

8.2 Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

8.2.1 Expansão clonal mitótica (MCE)

A fim de se avaliar o papel da rSAA nos eventos precoces da diferenciação, investigou-se os processos de mitose de células pós-confluentes estimuladas com MDI, incluindo os estágios de proliferação e as diferentes fases do ciclo celular dos pré-adipócitos. A Figura 11 mostra as células em diferentes fases do ciclo celular após a indução adipogênica nas primeiras 24 horas. Como esperado, a mudança do perfil em cada fase do ciclo celular se altera consideravelmente na presença do MDI. A presença da rSAA promoveu a progressão do ciclo, ou seja, a passagem da fase G0/G1 para a S e posteriormente para a fase G2/M. Em 12 horas de estímulo adipogênico, percebeu-se uma maior porcentagem de células na fase G2/M em células pré-tratadas com MDI + rSAA 5 μ g/mL ($18,1 \pm 0,4\%$) quando comparadas com células tratadas com MDI isoladamente ($14,5 \pm 0,81\%$, $p < 0,0001$). Nas 6 horas seguintes, o perfil das células em cultura foi alterado intensamente pelo MDI, mesmo assim, o mesmo fenômeno foi observado para as culturas tratadas com MDI + 5 μ g/mL de rSAA ($47,6 \pm 1,7\%$ vs MDI $42,1 \pm 3,0\%$, $p < 0,001$). Finalmente em 24 horas de estímulo, o perfil inicial é retomado.

A Figura 12 mostra a curva de crescimento celular e a incorporação de [metil-³H]-timidina durante as primeiras 72 horas após o estímulo com MDI ou meio sem hormônios adipogênicos (controle), na presença e ausência da rSAA. Observou-se um aumento no número de células na presença do estímulo adipogênico, o que não ocorreu com as células nas situações controle. A presença de SAA não afetou as duas condições acima citadas.

Figura 11. Células 3T3-L1 tratadas com rSAA nas diferentes fases do ciclo celular após a indução MDI. As células foram expostas a proteína pelos períodos indicados. (A) Histogramas ilustrando a intensidade de fluorescência emitida pelo PI em células confluentes mantidas em cultura nas condições acima indicadas. Percentual de células 3T3-L1 nas diferentes fases do ciclo celular 12 (B), 18 (C) e 24 horas (D) nas condições indicadas, (3 experimentos independentes, n= 9, ** p < 0,01, *** p < 0,001, em relação à cultura tratada com MDI).

8.2.2 Diferenciação de células 3T3-L1

Tendo em vista as evidências que mostraram os efeitos adipogênicos da SAA nos estágios precoces da diferenciação, decidiu-se verificar a influência desta proteína no processo de diferenciação no que tange a regulação da expressão de genes envolvidos, assim como no acúmulo (lipogênese) e liberação (lipólise) de lipídeos intracelulares. Para isso, a diferenciação de 3T3-L1 foi induzida na presença e ausência de rSAA.

Na Figura 13A e 13 B, as culturas diferenciadas foram coradas com Oil Red O, um corante de lipídeos neutros e visualizadas microscopicamente. Além disso, o corante foi extraído e quantificado por espectrofotometria (13B). Observou-se uma diminuição do resíduo de corante nas células diferenciadas na presença de rSAA nos dias 5 e 7 após o início do estímulo, sugerindo uma inibição do processo de diferenciação pela diminuição do acúmulo de lipídeos intracelulares. Adicionalmente, o glicerol liberado no meio de cultura durante o

processo foi determinado, parâmetro utilizado para a determinação da lipólise. Diferentemente da determinação de lipídeos intracelulares, não houve diferença nas concentrações de glicerol liberados no meio.

Figura 12. Curva de crescimento e incorporação de [metil-³H]-timidina em células tratadas durante a MCE. Pré-adipócitos 3T3-L1 após estímulo com MDI ou meio sem estímulo adipogênico, na presença e ausência de SAA. (A) Incorporação de [metil-³H]-timidina de culturas tratadas com meio sem estímulo

(preto), rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ (cinza claro), MDI (cinza) e MDI + rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ (branco). Valor da radioatividade (cpm/poço) da cultura controle foi considerado 100%. (***) $p < 0,001$ em relação a 24 horas, $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ em relação a 48 horas e $\#\#$ $p < 0,01$ em relação a 72 horas) (B) Curva de crescimento de células sem estímulo ($\blacksquare$), rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ ($\bullet$), MDI ($\square$) e MDI + rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$ ($\circ$). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão, (***) $p < 0,001$ em relação ao controle).

Figura 13. Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. (A) Células estimuladas com MDI e (B) células expostas a rSAA (5 $\mu\text{g/mL}$) durante toda a diferenciação, coradas com *Oil Red O* 7º dia da diferenciação (400x). (C) Valores de

absorbância do resíduo de *Oil Red O* intracelular dissolvido em metanol. (D) Determinação de glicerol no sobrenadante da cultura durante o processo de diferenciação. Células em condição considerada controle (preto) e estimuladas com rSAA 5 µg/mL (branco). Os valores foram expressos em média ± erro padrão de 4 experimentos independentes (n = 12), *** p < 0,001, ** p < 0,01 em relação ao controle do dia.

8.2.3 Expressão gênica durante a diferenciação

Para a determinação da expressão gênica, inicialmente foi realizada a validação do método de análise. A partir dos dados de amplificação das diluições dos cDNAs, foi calculado o ΔC_t de cada gene de interesse ($C_{t_{alvo}} - C_{t_{constitutivo}}$). A Figura 14 mostra as curvas de eficiência dos genes em questão e seus respectivos valores de inclinação da reta (*slope*).

Após a validação, determinou-se a expressão de três fatores necessários para a formação de adipócitos maduros responsivos à insulina, os fatores de transcrição C/EBP β e C/EBP α , além do receptor e também fator de transcrição PPAR γ (1 e 2). A Figura 15 mostra que a expressão dos 4 marcadores. Durante as primeiras 48 horas, a expressão dos mRNAs apresentou-se aumentada nas culturas estimuladas com MDI + rSAA 5 µg/mL. Entretanto, nas 24 horas subseqüentes, apresentou-se consideravelmente diminuída nas culturas tratadas com rSAA, se comparadas às culturas controle.

Figura 14. Curvas de eficiência para validação do método comparativo do parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As curvas foram realizadas com o ΔCt dos genes (A) FABP4,

(B) PPAR γ 2, (C) C/EBP α , (D) PPAR γ 1, (E) perilipina, (F), GLUT4 e (G) C/EBP β utilizando-se o gene 18S como gene de referência endógena. O critério de validação foi estabelecido com $slope < |0,1|$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Figura 15. Expressão de fatores de transcrição adipogênicos durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 nas primeiras 72 horas após indução com MDI (■) e MDI + rSAA 5 mg/mL (○). Ao final dos períodos indicados, o RNA total das células foi extraído para quantificação da expressão dos mRNAs do (A) C/EBP β , (B) PPAR γ 1, (C) C/EBP α e (D) PPAR γ 2, por qPCR. Os resultados mostram média $\pm$ erro padrão do parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ em relação ao controle do dia).

Numa etapa posterior, avaliou-se o grau de diferenciação nas primeiras horas do processo pela expressão de algumas proteínas adipogênicas. A Figura 16 mostra a expressão do mRNAs da proteína perilipina e da FABP4. Como indicado, a expressão apresentou-se diminuída nas culturas de células estimuladas com rSAA após o período de 72 horas em comparação à situação controle.

Figura 16. Expressão de proteínas adipogênicos durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 nas primeiras 72 horas após indução com MDI (■) e MDI + rSAA 5 mg/mL (○). Ao final dos períodos indicados o RNA total das células foi extraído para quantificação da expressão dos mRNAs da (A) perilipina e (B) da FABP4 por qPCR. Os resultados mostram média $\pm$ erro padrão do parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$, (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ em relação ao controle do dia).

8.3 Metabolismo nos pré-adipócitos 3T3-L1

Diante das evidências de diminuição da diferenciação de células 3T3-L1 pela rSAA, investigou-se a participação desta proteína no perfil metabólicos de células já diferenciadas. Com este intuito, realizaram-se ensaios de captação de 2-desoxi-[1,2-³H]-D-glicose, lipólise (determinado pelo glicerol no sobrendante celular) e expressão de GLUT4 no início da diferenciação. Diferentemente dos perfis de lipólise no item anterior, a rSAA alterou a liberação de glicerol em células diferenciadas, quando estimuladas por 24 horas com a proteína (Figura 17A). Com relação ao metabolismo de glicose, houve uma diminuição da captação deste carboidrato marcado radioativamente nas células tratadas com rSAA na concentração de 10 µg/mL (Figura 17C). Entretanto, ao analisar-se a expressão do receptor GLUT4, as culturas tratadas com rSAA apresentaram uma diminuição significativa, mesmo nos períodos iniciais da diferenciação, conforme mostrado da Figura 17B.

Figura 17. Metabolismo da glicose em células 3T3-L1 tratadas com rSAA. (A) Determinação da lipólise em 3T3-L1 diferenciadas estimuladas com rSAA por 24 horas, (** $p < 0,01$ em relação ao controle). (B) Expressão do receptor GLUT4 durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ em relação ao controle do dia). (C) Captação da 2-desoxi-[1,2- ^3H]-D-glicose na ausência (preto) e na presença (branco) de insulina 200 nM. Valor da radioatividade (cpm/poço) da cultura controle estimulado com insulina foi considerado 100% (** $p < 0,01$ em relação ao controle). Os valores de 3 experimentos independentes ($n=9$).

8.4 Citocinas pró-inflamatórias e a proteína SAA3 na diferenciação de 3T3-

L1

Durante o processo de diferenciação, verificou-se a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α e a IL-6 no sobrenadante celular. As culturas foram submetidas à diferenciação com MDI e estimuladas durante todo o período com rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 18 mostra um aumento significativo das duas citocinas no sobrenadante das culturas tratadas com MDI + rSAA 5 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se um aumento de 9 e 3 vezes a concentração de IL-6 e TNF- α , respectivamente, nas culturas tratadas com rSAA, se comparada às controle.

Figura 18. Liberação de citocinas pró-inflamatórias durante a diferenciação celular. As células submetidas à diferenciação com MDI (●) e MDI contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de rSAA (○). O sobrenadante celular foi coletado nos tempos indicados. (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ em relação ao controle do dia).

Nas mesmas condições acima descritas, conduziu-se a diferenciação a fim de determinar a expressão e síntese da proteína SAA3 nas células 3T3-L1. A Figura 19A mostra a expressão do mRNA da SAA3 na presença do estímulo com rSAA. Observou-se um aumento considerável na expressão da proteína na condição MDI + rSAA 5 µg/mL, cerca de 90x. Adicionalmente, o lisado celular das culturas submetidas à diferenciação foi analisado. Verificou-se um aumento de aproximadamente 2 vezes a concentração de SAA3 nas culturas celulares tratadas com MDI + rSAA 5 µg/mL, como mostrado na Figura 19B.

Figura 19. Expressão de proteína SAA3 durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 nas primeiras 72 horas após indução com MDI (●) e MDI + rSAA 5 mg/mL (○). (** e φφφ p < 0,001, ** e φφ p < 0,01 em relação ao controle do dia).

Esperando contribuir para a compreensão da influência da SAA nos processos de aquisição e perda do tecido adiposo, realizaram-se experimentos com pré-adipócitos murinos 3T3-L1. A hipótese da participação da SAA na obesidade foi formulada inicialmente pela observação de sua expressão gênica durante o processo de diferenciação de adipócitos murinos (Fasshauer, Klein *et al.*, 2004; Han, Subramanian *et al.*, 2007), bem como a presença constitutiva da proteína *per se* nos adipócitos maduros (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005; Poitou, Coussieu *et al.*, 2006). Neste contexto, mostrou-se que o tratamento de pré-adipócitos subconfluentes com rSAA promoveu um aumento considerável na proliferação celular. Este fenômeno foi dose-dependente e confirmado com um aumento da porcentagem de células na fase S do ciclo celular.

A importância dos resultados obtidos para o processo de adipogênese está amparada ao fato de que fibroblastos especializados comprometidos com a linhagem adipogênica são responsáveis pelo aparecimento de novos adipócitos *in vivo*. Recentemente, células progenitoras do tecido adiposo branco, localizadas no compartimento estromal foram identificadas como capazes de reconstituir a massa adiposa em condições de lipodistrofia (Rodeheffer, Birsoy *et al.*, 2008; Tang, Zeve *et al.*, 2008). Desta maneira, a proliferação de células precursoras de adipócitos na regência da SAA estaria contribuindo para os processos de aquisição do tecido adiposo.

Efeitos similares aos observados neste trabalho com a rSAA foram descritos para outras quatro moléculas biologicamente importantes: os fatores de

crescimento IGF-1 (Benito, Valverde *et al.*, 1996) e KGF (Zhang, Guan *et al.*, 2010), a grelina (Kim, Yoon *et al.*, 2004; Liu, Lin *et al.*, 2009), um hormônio secretado pelo estômago e responsável por regular favoravelmente a ingestão calórica e a BMP-3, um potente agente anti-osteogênico (Bahamonde e Lyons, 2001). Para a BMP-3 e o KGF, foi observado um efeito dose-dependente da mesma forma que observamos para rSAA. Dentre os fatores mencionados acima, o único que não mostrou este efeito foi a grelina. De qualquer forma, tanto para a rSAA quanto para a grelina, o efeito proliferativo foi observado em concentrações similares às concentrações fisiológicas plasmáticas, sugerindo uma ação mitogênica em situação de homeostase.

As ações proliferativas da rSAA foram comparadas às ações da insulina. Nos resultados, a insulina aumentou a incorporação de timidina marcada radioativamente em cerca de 4 vezes, quando comparada ao controle. Adicionalmente, como esperado, observou-se uma inibição parcial da proliferação induzida por insulina na presença do inibidor da via da PI3K, a wortmanina. Esta via é bem descrita na literatura e participa da cascata de transdução de sinais de vários receptores do tipo tirosina quinase incluindo receptores de insulina e de IGF-1 (Gagnon, Dods *et al.*, 2001; Jiang, Zhou *et al.*, 2005; Lodeiro, Theodoropoulou *et al.*, 2009).

Apesar de termos adicionado o inibidor da PI3K, não se pode descartar a participação desta via de sinalização, pois o inibidor por si só afetou as culturas controle numa proporção similar aquela observada na presença de rSAA. Outra via que reconhecidamente está envolvida na proliferação celular e que poderia coordenar estes efeitos, é a via das MAPKs, na qual se conhece que as ERK1/2

estão envolvidas no controle do ciclo celular e no processo de diferenciação (Tanabe, Koga *et al.*, 2004; Bost, Aouadi *et al.*, 2005; Aouadi, Laurent *et al.*, 2006). Neste âmbito, observou-se que o bloqueio da via das MAPKs, utilizando o inibidor PD98059, diminuiu o efeito da SAA na proliferação dos pré-adipócitos. Também não se pode excluir a participação da $p38^{MAPK}$, via inibidor SB203580, pois também houve um efeito inibitório nas culturas controle.

A via de sinalização das MAPK é ativada por uma variedade de estímulos, mas geralmente assume-se que a ERK1/2 são ativadas por mitógenos como, por exemplo, fatores de crescimento. Este fato apóia outros efeitos descritos pelo nosso grupo de pesquisa, de que rSAA tem comportamento similar a um fator de crescimento (Knebel, 2010).

Numa análise conjunta dos fatores que induzem proliferação pelas vias de sinalização estudadas, tem-se que tanto a insulina quanto a grelina utilizam as vias da PI3K e da ERK1/2. Para a rSAA, reconheceu-se a participação da via ERK1/2.

Diante das evidências do envolvimento da via de sinalização da ERK1/2, houve a tentativa de verificar se o efeito mitogênico da rSAA era, de alguma maneira, via ativação de receptor acoplado à proteína Gi. Recentemente, nosso grupo descreveu que a atividade da rSAA na indução da liberação da quimiocina CCL20 por mononucleares se dava, em parte, via receptor FPR2 (Sandri, Hatanaka *et al.*, 2008). Outro relato importante, remete à ação mitogênica da grelina acima descrita, onde este efeito foi associado à ativação deste mesmo receptor. Entretanto, diante dos resultados descritos, descartou-se a participação do receptor FPR2 na ação mitogênica da rSAA em pré-adipócitos 3T3-L1.

Diante do efeito mitogênico da rSAA sobre pré-adipócitos subconfluentes, decidiu-se investigar se a proteína poderia influenciar a diferenciação de pré-adipócitos. Assim, iniciou-se os experimentos de diferenciação pelos eventos precoces do processo, a chamada MCE. A observação de que a rSAA não influenciou a MCE de forma expressiva, fez-se remeter aos relatos de alguns autores sobre o papel desta fase na diferenciação celular (Qiu, Wei *et al.*, 2001; Guo, Zhang *et al.*, 2009). O fato de não haver alteração nos estágios precoces do processo de diferenciação não exclui necessariamente os estágios seguintes, como a aquisição de lipídeos e a maturação do adipócito. Adicionalmente, uma análise geral e comparativa mostra que SAA, da mesma forma que descrito para o fator de crescimento *epidermal growth factor* (EGF), aumenta a proliferação de 3T3-L1, mas não altera o MCE, apesar de atuarem em estágios finais da diferenciação (Harrington, Pond-Tor *et al.*, 2007). Estes dados amparam a sugestão de que a MCE ocorre de forma independente do processo de diferenciação (Qiu et al. 2001, Guo et al. 2009).

Neste contexto, experimentos de aquisição do fenótipo de adipócito foram executados. A rSAA promoveu uma inibição da formação de lipídeos intracelulares durante todo o processo de diferenciação, além dos fatores de transcrição relacionados à adipogênese terem diminuído. A inibição da expressão da FABP4 pela rSAA já havia sido relatada em células mesenquimais totalmente diferenciadas de porcos, sugerindo a SAA como um inibidor da lipogênese (Chen, Wang *et al.*, 2008). Nos resultados descritos, a diminuição da aquisição de lipídeos intracelulares em células em processo de diferenciação foi evidente; a SAA é capaz de diminuir a adipogênese.

Ação similar aquela que se observou para SAA já havia sido relatada para TNF- α (Cawthorn, Heyd *et al.*, 2007; Guilherme, Tesz *et al.*, 2009). Assim como a rSAA, o TNF- α inibe a expressão de PPAR γ e do C/EBP α levando a perda da aquisição de lipídeos. Visto que nosso grupo relatou que SAA é capaz de induzir a expressão e síntese de TNF- α em diferentes tipos celulares (Furlaneto e Campa, 2000; Ribeiro, Furlaneto *et al.*, 2003; Hatanaka, Furlaneto *et al.*, 2004), a coexistência da citocina e da proteína rSAA no ambiente de diferenciação é favorável a perda da capacidade de acúmulo de lipídeos. Esta afirmação é baseada nos resultados descritos de produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias na presença do estímulo da rSAA.

Levando em consideração que a síntese e a liberação da SAA pelo adipócito estão aumentadas durante a hiperplasia e principalmente hipertrofia de adipócitos maduros (Poitou, Viguerie *et al.*, 2005; Sjöholm, Lundgren *et al.*, 2009), fica clara a participação da SAA nos processos que levam à resistência à insulina e a síndrome metabólica. Observou-se uma diminuição da expressão do receptor GLUT4 durante a diferenciação estimulada com rSAA. Ainda, estes resultados são condizentes com a diminuição da captação de glicose marcada radioativamente. Outro ponto importante do trabalho foi o perfil da lipólise. A presença da rSAA não alterou a liberação de glicerol durante a diferenciação, apesar da expressão gênica da perilipina apresentar-se diminuída. Entretanto, nas células já diferenciadas, a SAA promoveu aumento da lipólise. Este último dado é consistente com dados da literatura que apontam a SAA como indutor da lipólise (Chen, Wang *et al.*, 2008). Assim como a SAA, o TNF- α está diretamente relacionado com alterações significativas na lipólise de adipócitos, atuando

também de maneira a diminuir a expressão e a síntese da perilipina (Langin e Arner, 2006).

Diante das ações do TNF- α acima observadas, a SAA atuaria de forma similar ou mesmo atuando sinergicamente com outras citocinas. É fato que a SAA prejudica a aquisição de lipídeos por parte do tecido adiposo em situações de inflamação crônica ou mesmo em homeostase, evidenciado pela inibição da diferenciação dos pré-adipócitos. Associado ainda ao fato de que adipócitos maduros estão sujeitos às ações de lipases plasmáticas, ácidos graxos estariam em maior número na circulação, o que levaria a resistência periférica à insulina. Entretanto o fato da SAA estimular a proliferação de pré-adipócitos poderia acarretar um maior contingente de células capazes de se diferenciarem à adipócitos num momento seguinte à inflamação (Figura 20).

Figura 20. Esquema de mecanismo sugerido para a ação da SAA no tecido adiposo.

Finalmente, o aumento da expressão do mRNA da SAA3 bem como o aumento da produção da proteína nas culturas estimuladas sugere um mecanismo central de atuação, onde a rSAA, oriunda do fígado, estaria promovendo um processo inflamatório *in situ* que, por si só, estimularia a expressão e produção de SAA produzida pelo adipócito. Diante disto, sugere-se a hipótese de ação parácrina/autócrina para a SAA no tecido adiposo levando a perda da aquisição de lipídeos e resistência à insulina (Figura 21).

Figura 21. Hipótese de ação parácrina/autócrina da SAA no tecido adiposo.

A rSAA aumenta a proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1, promovendo a progressão do ciclo celular e aumento da viabilidade em condições de privação de soro;

A indução da proliferação pela rSAA utiliza a via de sinalização das ERK1/2 em pré-adipócitos subconfluentes 3T3-L1;

A rSAA inibe o processo de adipogênese em células 3T3-L1, evidenciado pela diminuição do armazenamento de lipídeos intracelulares e pela diminuição da expressão de genes adipogênicos aliados ao processo;

A rSAA previne a captação de glicose de adipócitos a partir da diminuição da expressão do receptor GLUT4. Ainda, favorece a lipólise por meio da diminuição da expressão da perilipina durante a adipogênese;

A rSAA promove a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos, bem como aumenta a expressão e síntese da proteína SAA3 no mesmo tecido.

ABE-DOHMAE, S. *et al.* Serum amyloid a generates HDL in an ABCA1-or ABCA7-dependent manner. *Atherosclerosis Supplements* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 539-539, 2006.

AOUADI, M. *et al.* Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* [S.I.], v. 55, n. 2, p. 281-289, 2006.

ARNER, P.; SPALDING, K. L. Fat cell turnover in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 396, n. 1, p. 101-104, May 2010.

BAHAMONDE, M. E.; LYONS, K. M. BMP3: To be or not to be a BMP. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* [S.I.], v. 83A, p. S56-S62, 2001.

BARANOVA, I. N. *et al.* Serum amyloid a binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 9, p. 8031-8040, 2005.

BASTARD, J. P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BENITO, M. *et al.* IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [S.I.], v. 28, n. 5, p. 499-510, 1996.

BIRAN, H. *et al.* SERUM AMYLOID-A (SAA) VARIATIONS IN PATIENTS WITH CANCER - CORRELATION WITH DISEASE-ACTIVITY, STAGE, PRIMARY SITE,

AND PROGNOSIS. *Journal of Clinical Pathology* [S.I.], v. 39, n. 7, p. 794-797, 1986.

BOKAREWA, M. *et al.* Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *Journal of Rheumatology* [S.I.], v. 34, n. 6, p. 1293-1301, 2007.

BORNSTEIN, S. R. *et al.* Is the Worldwide Epidemic of Obesity a Communicable Feature of Globalization? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [S.I.], v. 116, p. S30-S32, 2008.

BOST, F. *et al.* The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 51-56, 2005.

CAI, H. *et al.* Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 178, n. 3, p. 1852-1860, 2007.

CAI, L. *et al.* Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 4, p. 2954-2961, 2005.

CAWTHORN, W. P. *et al.* Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death and Differentiation* [S.I.], v. 14, n. 7, p. 1361-1373, Jul 2007.

CHEATHAM, B. *et al.* PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE ACTIVATION IS REQUIRED FOR INSULIN STIMULATION OF PP70 S6 KINASE, DNA-SYNTHESIS, AND GLUCOSE-TRANSPORTER TRANSLOCATION. *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 14, n. 7, p. 4902-4911, 1994.

CHEN, C. H. *et al.* Serum amyloid a protein regulates the expression of porcine genes related to lipid metabolism. *Journal of Nutrition* [S.I.], v. 138, n. 4, p. 674-679, 2008.

CHEN, Z. *et al.* MAP kinases. *Chemical Reviews* [S.I.], v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001.

CINTI, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* [S.I.], v. 297, n. 5, p. E977-E986, 2009.

CLARKE, J. F. *et al.* INHIBITION OF THE TRANSLOCATION OF GLUT1 AND GLUT4 IN 3T3-L1 CELLS BY THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE INHIBITOR, WORTMANNIN. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 300, p. 631-635, 1994.

DUFTON, N. *et al.* Anti-Inflammatory Role of the Murine Formyl-Peptide Receptor 2: Ligand-Specific Effects on Leukocyte Responses and Experimental Inflammation. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 184, n. 5, p. 2611-2619, 2010.

FAINTUCH, J. *et al.* Systemic inflammation and cardiovascular risk factors: Are morbidly obese subjects different? *Obesity Surgery* [S.I.], v. 18, n. 7, p. 854-862, 2008.

FARMER, S. R. Regulation of PPAR gamma activity during adipogenesis. *International Journal of Obesity* [S.I.], v. 29, p. S13-S16, 2005.

FASSHAUER, M. *et al.* Serum amyloid A3 expression is stimulated by dexamethasone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology* [S.I.], v. 183, n. 3, p. 561-567, 2004.

FURLANETO, C. J.; CAMPA, A. A novel function of serum amyloid A: A potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 268, n. 2, p. 405-408, 2000.

FURLANETO, C. J. *et al.* Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. *Lipids* [S.I.], v. 37, n. 9, p. 925-928, 2002.

FYFE, A. I. *et al.* Association between serum amyloid a proteins and coronary artery disease - Evidence from two distinct arteriosclerotic processes. *Circulation* [S.I.], v. 96, n. 9, p. 2914-2919, 1997.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GAGNON, A. *et al.* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate is required for insulin-like growth factor 1-mediated survival of 3T3-L1 preadipocytes. *Endocrinology* [S.I.], v. 142, n. 1, p. 205-212, 2001.

GOLLAHER, C. J.; BAUSSERMAN, L. L. HEPATIC CATABOLISM OF SERUM AMYLOID-A DURING AN ACUTE PHASE RESPONSE AND CHRONIC INFLAMMATION. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* [S.I.], v. 194, n. 3, p. 245-250, 1990.

GOMEZ-AMBROSI, J. *et al.* Serum amyloid A concentration is increased in obese children and adolescents. *Journal of Pediatrics* [S.I.], v. 153, n. 1, p. 71-75, 2008.

GORDON, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 89-93, Jan 2007.

GRAMMER, T. C.; BLENIS, J. Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene* [S.I.], v. 14, n. 14, p. 1635-1642, 1997.

GREEN, H.; KEHINDE, O. ESTABLISHED PRE-ADIPOSE CELL LINE AND ITS DIFFERENTIATION IN CULTURE .2. FACTORS AFFECTING ADIPOSE CONVERSION. *Cell* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 19-27, 1975.

GREGOIRE, F. M. *et al.* Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* [S.I.], v. 78, n. 3, p. 783-809, 1998.

GUILHERME, A. *et al.* Tumor Necrosis Factor-alpha Induces Caspase-mediated Cleavage of Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 284, n. 25, p. 17082-17091, Jun 2009.

GUO, W. *et al.* Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Research* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 216-223, 2009.

HAJDUCH, E. *et al.* Protein kinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport? *Febs Letters* [S.I.], v. 492, n. 3, p. 199-203, 2001.

HAMM, J. K. *et al.* A role for C/EBP beta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 276, n. 21, p. 18464-18471, May 2001.

HAN, C. Y. *et al.* Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes* [S.I.], v. 56, p. 2260-2273, 2007.

HARRINGTON, M. *et al.* Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis. *Obesity* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 563-571, Mar 2007.

HATANAKA, E. *et al.* Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunology Letters* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 33-37, 2004.

_____. Interaction between serum amyloid A and leukocytes - A possible role in the progression of vascular complications in diabetes. *Immunology Letters* [S.I.], v. 108, n. 2, p. 160-166, 2007.

HE, R. *et al.* Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood* [S.I.], v. 101, n. 4, p. 1572-1581, 2003.

HE, R. L. *et al.* Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* [S.I.], v. 113, n. 2, p. 429-437, 2009.

HILLIQUIN, P. Biological markers in inflammatory rheumatic diseases. *Cellular and Molecular Biology* [S.I.], v. 41, n. 8, p. 993-1006, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* INCREASED ADIPOSE-TISSUE EXPRESSION OF TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA IN HUMAN OBESITY AND INSULIN-RESISTANCE. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 95, n. 5, p. 2409-2415, 1995.

_____. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* [S.I.], v. 271, n. 5249, p. 665-668, 1996.

INOUE, K. E. *et al.* Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* [S.I.], v. 56, n. 9, p. 2242-2250, Sep 2007.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 334, p. 489-503, 1998.

JIANG, Z. Y. *et al.* Identification of WNK1 as a substrate of Akt/protein kinase B and a negative regulator of insulin-stimulated mitogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 22, p. 21622-21628, 2005.

JYLHAVA, J. *et al.* Serum amyloid A is independently associated with metabolic risk factors but not with early atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Journal of Internal Medicine* [S.I.], v. 266, n. 3, p. 286-295, 2009.

KANDA, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 116, n. 6, p. 1494-1505, Jun 2006.

KIM, M. S. *et al.* The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* [S.I.], v. 18, n. 9, p. 2291-2301, 2004.

KIM, S. H. *et al.* Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 372, n. 1, p. 108-113, 2008.

KIRK, E. A. *et al.* Macrophage chemoattractant protein-1 deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. *Diabetes* [S.I.], v. 57, n. 5, p. 1254-1261, May 2008.

KNEBEL, F. H. *Ação da Amilóide Sérica A em Linhagens Celulares de Glioma Humano.* (2010). (Mestrado) - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KO, C. H. *et al.* Flavanones structure-related inhibition on TPA-induced tumor promotion through suppression of extracellular signal-regulated protein kinases: Involvement of prostaglandin E-2 in anti-promotive process. *Journal of Cellular Physiology* [S.I.], v. 193, n. 1, p. 93-102, 2002.

KOPELMAN, P. G. Is the hypothalamic-pituitary-adrenal axis really hyperactivated in visceral obesity? *Journal of Endocrinological Investigation* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 76-79, 1999.

KOPELMAN, P. G.; ALBON, L. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 322-340, 1997.

KUMON, Y. *et al.* SERUM AMYLOID-A PROTEIN IN PATIENTS WITH NON-INSULIN-DEPENDENT DIABETES-MELLITUS. *Clinical Biochemistry* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 469-473, 1994.

LAAKE, I. *et al.* A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Cancer in the Proximal and Distal Colon. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [S.I.], v. 19, n. 6, p. 1511-1522, 2010.

LANGIN, D.; ARNER, P. Importance of TNF alpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* [S.I.], v. 17, n. 8, p. 314-320, 2006.

LARSON, M. A. *et al.* Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 301, n. 4, p. 1030-1037, 2003.

LEE, H. *et al.* Reactive Oxygen Species Facilitate Adipocyte Differentiation by Accelerating Mitotic Clonal Expansion. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 284, n. 16, p. 10601-10609, 2009.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. Inflamed about obesity. *Nature Medicine* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 126-127, 2004.

LEITZMANN, M. F. *et al.* Prospective study of body mass index, physical activity and thyroid cancer. *International Journal of Cancer* [S.I.], v. 126, n. 12, p. 2947-2956, 2010.

LI, X. *et al.* Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBP beta during adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 104, n. 28, p. 11597-11602, Jul 2007.

LIU, J. *et al.* Effects of ghrelin on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 227-230, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* [S.I.], v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LODEIRO, M. *et al.* c-Src Regulates Akt Signaling in Response to Ghrelin via beta-Arrestin Signaling-Independent and -Dependent Mechanisms. *Plos One* [S.I.], v. 4, n. 3, 2009.

LONGO, K. A. *et al.* Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 277, n. 41, p. 38239-38244, 2002.

LUMENG, C. N. *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 175-184, Jan 2007.

MADOFF, D. H. *et al.* INSULIN AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I STIMULATE THE PHOSPHORYLATION ON TYROSINE OF A 160 KDA CYTOSOLIC PROTEIN IN 3T3-L1 ADIPOCYTES. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 252, n. 1, p. 7-15, 1988.

MADSEN, L. *et al.* Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* [S.I.], v. 1740, n. 2, p. 266-286, 2005.

_____. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochemical Journal* [S.I.], v. 375, p. 539-549, 2003.

MARTINEZ-BOTAS, J. *et al.* Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr* db db mice. *Nature Genetics* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 474-479, 2000.

MELNYK, B. M. *et al.* The worldwide epidemic of child and adolescent overweight and obesity: Calling all clinicians and researchers to intensify efforts in prevention and treatment. *Worldviews on Evidence-Based Nursing* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 109-112, 2008.

MIYOSHI, H. *et al.* Perilipin Overexpression Decreases Adipocyte Size and Protects Against Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance. *Diabetes* [S.I.], v. 58, p. A357-A357, 2009.

_____. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *Journal of Lipid Research* [S.I.], v. 51, n. 5, p. 975-982, 2010.

O'HARA, R. *et al.* Acute-phase serum amyloid - A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Research* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 142-U4, 2000.

PETERSEN, R. K. *et al.* Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 28, n. 11, p. 3804-3816, 2008.

POITOU, C. *et al.* Serum amyloid A: A marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 309-318, 2006.

_____. Serum amyloid A: production by human white adipocyte and regulation by obesity and nutrition. *Diabetologia* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 519-528, 2005.

QIU, Z. L. *et al.* DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 276, n. 15, p. 11988-11995, 2001.

RIBEIRO, F. P. *et al.* mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes. *Mediators of Inflammation* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 173-178, 2003.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. The multiple facets of the fat tissue. *Thyroid* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 175-183, Feb 2008.

_____. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 399-409, Jun 2009.

RODEHEFFER, M. S. *et al.* Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell* [S.I.], v. 135, n. 2, p. 240-249, 2008.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [S.I.], v. 7, n. 12, p. 885-896, 2006.

ROSEN, E. D. *et al.* Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development* [S.I.], v. 14, n. 11, p. 1293-1307, Jun 2000.

ROSS, R. Atherosclerosis - An inflammatory disease - Reply. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 340, n. 24, p. 1929-1929, 1999.

ROSS, S. E. *et al.* Microarray analyses during adipogenesis: Understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 22, n. 16, p. 5989-5999, 2002.

SAITO, T. *et al.* Flavanone exhibits PPAR gamma ligand activity and enhances differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 380, n. 2, p. 281-285, 2009.

SAMOLIS, S. *et al.* Relation between first trimester maternal serum leptin levels and body mass index in normotensive and pre-eclamptic pregnancies - Role of leptin as a marker of pre-eclampsia: A prospective case-control study. *Gynecological Endocrinology* [S.I.], v. 26, n. 5, p. 338-343, 2010.

SANDRI, S. *et al.* Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. *Immunology Letters* [S.I.], v. 121, n. 1, p. 22-26, Nov 2008.

_____. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Journal of Leukocyte Biology* [S.I.], v. 83, n. 5, p. 1174-1180, 2008.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SEALE, P. *et al.* Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function-of mice and men. *Genes & Development* [S.I.], v. 23, n. 7, p. 788-797, 2009.

SHAH, C. *et al.* Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* [S.I.], v. 108, n. 5, p. 1751-1757, 2006.

SJOHOLM, K. *et al.* Association of serum amyloid A levels with adipocyte size and serum levels of adipokines: Differences between men and women. *Cytokine* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 260-266, 2009.

SMITH, P. J. *et al.* INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I IS AN ESSENTIAL REGULATOR OF THE DIFFERENTIATION OF 3T3-L1 ADIPOCYTES. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 263, n. 19, p. 9402-9408, 1988.

SOUKAS, A. *et al.* Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 276, n. 36, p. 34167-34174, 2001.

SOUZA, S. C. *et al.* Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 273, n. 38, p. 24665-24669, 1998.

SPIEGELMAN, B. M. *et al.* ELEVATION OF ADIPOSE-TISSUE EXPRESSION OF TNF-ALPHA AND TNF RECEPTORS IN HUMAN OBESITY AND INSULIN-RESISTANCE. *Diabetes* [S.I.], v. 44, p. A45-A45, 1995.

STEEL, D. M. *et al.* A CONSTITUTIVELY EXPRESSED SERUM AMYLOID-A PROTEIN GENE (SAA4) IS CLOSELY LINKED TO, AND SHARES STRUCTURAL SIMILARITIES WITH, AN ACUTE-PHASE SERUM AMYLOID-A PROTEIN GENE (SAA2). *Genomics* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 447-454, 1993.

STEWART, A. *et al.* BMP-3 Promotes Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through the TGF-beta/Activin Signaling Pathway. *Journal of Cellular Physiology* [S.I.], v. 223, n. 3, p. 658-666, 2010.

TANABE, Y. *et al.* Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR gamma(2). *Journal of Cell Science* [S.I.], v. 117, n. 16, p. 3605-3614, 2004.

TANG, Q. Q. *et al.* Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3 beta is required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 102, n. 28, p. 9766-9771, Jul 2005.

_____. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 44-49, 2003.

TANG, W. *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* [S.I.], v. 322, n. 5901, p. 583-586, Oct 2008.

TANSEY, J. T. *et al.* Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 98, n. 11, p. 6494-6499, 2001.

TOMIYAMA, K. *et al.* WORTMANNIN, A SPECIFIC PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE INHIBITOR, INHIBITS ADIPOCYTIC DIFFERENTIATION OF 3T3-L1 CELLS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 212, n. 1, p. 263-269, 1995.

_____. Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. *Japanese Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 80, n. 4, p. 375-378, 1999.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* [S.I.], v. 35, p. W71-W74, 2007.

URIELI-SHOVAL, S. *et al.* Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Current Opinion in Hematology* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 64-69, 2000.

VAN DER WESTHUYZEN, D. R. *et al.* Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 280, n. 43, p. 35890-35895, 2005.

VIRKAMAKI, A. *et al.* Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 103, n. 7, p. 931-943, 1999.

WALDER, K. *et al.* Tanis: A link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes* [S.I.], v. 51, n. 6, p. 1859-1866, 2002.

WEISBERG, S. P. *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 116, n. 1, p. 115-124, Jan 2006.

_____. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* [S.I.], v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec 2003.

XIA, X. M.; SERRERO, G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Journal of Cellular Physiology* [S.I.], v. 178, n. 1, p. 9-16, 1999.

XING, Y. F. *et al.* Matrine inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation associated with suppression of ERK1/2 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 396, n. 3, p. 691-695, 2010.

YAN, S. D. *et al.* Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nature Medicine* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 643-651, 2000.

YANG, R. Z. *et al.* Acute-phase serum amyloid A: An inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *Plos Medicine* [S.I.], v. 3, p. 884-894, 2006.

ZHANG, T. *et al.* Keratinocyte Growth Factor Promotes Preadipocyte Proliferation via an Autocrine Mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry* [S.I.], v. 109, n. 4, p. 737-746, 2010.