



Universidade Federal de Juiz de Fora

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia

Sabrina Pires Maciel

**Papel da obesidade e do desenvolvimento de tumores de
mama na resposta inflamatória durante infecções por
patógenos intracelulares: análise de corpúsculos lipídicos e
mediadores inflamatórios em macrófagos**

Juiz de Fora

2015

Sabrina Pires Maciel

Papel da obesidade e do desenvolvimento de tumores de mama na resposta inflamatória durante infecções por patógenos intracelulares: análise de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios em macrófagos

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias

Orientadora: Prof^a Dr^a. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro

Juiz de Fora

2015

MACIEL, S.P. Papel da obesidade e do desenvolvimento de tumores de mama na resposta inflamatória durante infecções por patógenos intracelulares: análise de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios em macrófagos (2015). Dissertação de mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora

Sabrina Pires Maciel

Papel da obesidade e do desenvolvimento de tumores de mama na resposta inflamatória durante infecções por patógenos intracelulares: análise de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios em macrófagos

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias

Aprovado em _____ de _____ de 2015

Banca Examinadora

Profª Drª Danielle de Oliveira Nascimento – **UFRJ- RJ**

Profª Drª Jacy Gameiro – **UFJF – MG**

Profª Drª. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro – **UFJF – MG**

Juiz de Fora

2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me enviar essa oportunidade e colocar as pessoas certas no meu caminho, por me abençoar e cuidar da minha saúde, mesmo quando tudo parecia estar perdido. Especialmente por me colocar no mundo como membro de uma família maravilhosa. Meus pais, José Satiro e Joana, que me educaram da melhor forma possível, me apoiaram em todas as decisões, compreenderam a minha ausência e me consolaram nos momentos de saudade. Sem dúvida, sou conseqüência do amor dessas duas pessoas que me inspiraram a chegar até aqui, com a certeza de que posso ir além. Minha irmã, Tanita, sempre paciente e prestativa, esteve sempre do meu lado. Meu namorado, Walter, que há quatro anos faz parte da minha vida. Obrigada pela paciência, pelos empurrões diante meus momentos de desânimo, por me amar, me apoiar e compreender as dificuldades de sair aos finais de semana porque tinha que estudar. Essa é a minha família a quem eu digo “Amo vocês!”

Desde quando me formei no curso de Biomedicina me interessei em fazer um mestrado e dentre diversas opções, Deus me colocou em um caminho onde conheci a Prof^a Heloísa, que aceitou a me orientar sem ao menos me conhecer. Obrigada Helô, pela confiança, pelos ensinamentos, correções, puxões de orelha, paciência, mensagens trocadas pela madrugada, ajuda com os experimentos, pela atenção e por todo o conhecimento que me passou. Sem dúvida se tornará um espelho e modelo para o meu futuro. À Prof^a Jacy e suas alunas Ana, Gabriela e Pollyanna, pela colaboração, que foi essencial para meu projeto, pelos materiais, pela paciência e boa vontade.

Gostaria de agradecer também à toda equipe do Laboratório de Biologia Celular, pois “caí de pára-quedas” e me senti totalmente perdida no início. Em especial, o aluno de mestrado Gabriel e de doutorado Daniel, por toda paciência e boa vontade em me auxiliar e ensinar, pelas ajudas com os experimentos que duravam mais de 12 horas. Realmente foi cansativo. Aos alunos de Iniciação Científica, que são uma peça do quebra-cabeça e me ajudaram nos experimentos, contas, limpeza, etc... A todos os professores do

programa de Pós-Graduação pelos conhecimentos transmitidos, pelas dicas, pelos seminários e ajuda.

A dificuldade por estar longe de casa me afastou um pouco, pois tive que procurar um emprego que ajudasse a me manter em Juiz de Fora e embora trabalhasse de plantão, sempre houve tempo para cumprir os créditos, realizar provas, seminários, acompanhar e realizar experimentos. Agradeço às minhas colegas do laboratório Celab por me receberem de braços abertos e por depositar em mim uma enorme confiança. Em especial, agradeço imensamente à bioquímica Nelsione, pela compreensão, pelo ombro amigo, pelas folgas e pelas trocas de plantões. Todas foram e são pessoas essenciais para meu desenvolvimento profissional.

Enfim, agradeço também, a todos os meus amigos, de Três Corações e de Juiz de Fora, que me desejaram boa sorte, compreenderam minha ausência e ainda assim são meus amigos.

São várias as pessoas que, de alguma forma, contribuíram com o esperado momento de me tornar mestre. Obrigada a todos que fazem parte da minha vida!

Sabrina P. Maciel

RESUMO

O câncer de mama é uma neoplasia maligna que se desenvolve no tecido mamário, caracterizado pelo crescimento desordenado das células epiteliais. É o cancro mais freqüente nas mulheres e sofre influência da obesidade. Sendo a obesidade e o câncer condições que direcionam um processo inflamatório crônico, cabe a necessidade de se estudar os mediadores dessa reação e suas possíveis conseqüências para o organismo. Corpúsculos lipídicos (CL) são organelas dinâmicas envolvidas no metabolismo de lipídeos e sinalização intracelular, que aumentam em número e tamanho nos leucócitos envolvidos nos processos inflamatórios, neoplásicos e infecciosos, incluindo infecções intracelulares por *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*. A lipogênese está associada com o mau prognóstico em diversas neoplasias, sugerindo o papel dos CLs no desenvolvimento do câncer. Diante disso, o presente trabalho estudou a correlação do tumor de mama e da obesidade na resposta inflamatória durante infecções por *M. bovis* BCG e *T. cruzi*. Para esse propósito, camundongos Balb/c fêmeas foram tratados com dieta padrão e hiperlipídica por 16 semanas e estimulados com células da linhagem tumoral 4T1 por 14 dias. Macrófagos foram extraídos do tecido adiposo e do peritônio e re-estimulados *in vitro* com *M. bovis* BCG e *T. cruzi* para a análise da formação de CLs, citocinas e eicosanóides. Os resultados demonstraram que macrófagos obtidos de animais obesos estimulados *in vivo* com células tumorais e *in vitro* com BCG e *T. cruzi*, apresentam o número de CLs consideravelmente aumentando, mostrando que a presença das células tumorais e obesidade são capazes de estimular processo inflamatório, tendo em vista a formação destas organelas. Além disso, macrófagos de animais obesos apresentaram maior produção de PGE₂ e expressão de COX-2 que os de animais magros. Foi demonstrado também que macrófagos dos animais obesos com tumores quando foram re-estimulados exibiram aumento significativo na síntese de leptina e das citocinas TNF- α , TGF- β em comparação com os macrófagos de animais magros com tumores. Como conclusão, nossos resultados sugerem que o desenvolvimento tumoral, em conjunto com a obesidade, potencia a formação dos CLs e a síntese de mediadores inflamatórios durante infecções por patógenos intracelulares, como BCG e *T. cruzi*, sugerindo o papel dos CLs como alvo para futuras intervenções terapêuticas no sentido de influenciar o balanço das interações entre o patógeno e o hospedeiro.

ABSTRACT

Breast cancer is a malignant neoplasm that develops in the breast tissue, characterized by the uncontrolled growth of epithelial cells. It's the most frequent cancer in women and is influenced by obesity. As obesity and cancer conditions that drive to a chronic inflammatory process, have a need to study the mediators of this reaction and possible consequences for the organism. Lipid bodies (LB) are dynamic organelles involved in lipid metabolism and intracellular signaling, which is increase in number and size in leukocytes involved in the inflammatory, neoplastic and infectious processes, including intracellular *Mycobacterium bovis* BCG and *Trypanosoma cruzi*. The lipogenesis is associated with poor prognosis in several cancers, suggesting the role of LB in cancer development. Therefore, this study presents the correlation of breast tumor and obesity in the inflammatory response during infection by *M. bovis* BCG and *T. cruzi*. For this purpose, Balb/ c female mice were treated with standard and fat diet for 16 weeks and stimulated with tumor cells 4T1 for 14 days. Macrophages were extracted from adipose tissue and peritoneum and restimulated *in vitro* with *M. bovis* BCG and *T. cruzi* for analysis of formation of LBs, cytokines, and eicosanoids. The results showed that macrophages obtained from obese animals stimulated with tumor cells *in vivo* and with BCG and *T. cruzi* *in vitro*, LBs showed a number considerably increased, showing that the presence of tumor cells and obesity are capable of stimulating inflammatory process, having for training these organelles. Moreover, macrophages from obese animals had higher production of PGE2 and expression of COX-2 than in thin animals. It has also been shown that macrophages from obese animals when restimulated with tumors exhibited a significant increased synthesis of leptin and cytokine TNF- α , TGF- β compared to macrophages from thin animals with tumors. In conclusion, our results suggest that tumor growth, together with obesity, enhances the formation of LBs and the synthesis of inflammatory mediators during infections by intracellular pathogens such as BCG and *T. cruzi*, suggesting the role of target LBs for future therapeutic interventions to influence the balance of the interactions between the pathogen and the host.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Frequência de excesso de peso no Brasil de 2006 a 2013 em porcentagem

Figura 2: Frequência de obesidade no Brasil de 2006 a 2013 em porcentagem

Figura 3: Mudanças induzidas pela obesidade na infiltração e polarização de macrófagos

Figura 4: Estimativa para o ano de 2014 das taxas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária

Figura 5: Estrutura anatômica da mama

Figura 6: Esquema de ativação dos macrófagos pela apresentação de antígenos

Figura 7: Esquema do metabolismo do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase

Figura 8: Corpúsculos lipídicos em macrófagos ativados

Figura 9: Biogênese do corpúsculo lipídico

Figura 10: Esquema do delineamento experimental

Figura 11: Efeitos da dieta padrão e hiperlipídica nos camundongos Balb/c fêmeas

Figura 12: Formação de Corpúsculos lipídicos em macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio de animais obesos e magros com tumor de mama

Figura 13: Análise da produção de mediadores inflamatórios nos macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio de animais obesos e magros com tumor de mama e a expressão de COX-2

Figura 14: Análise da produção de adipocinas nos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos e magros com tumor de mama

Figura 15: Análise da produção de citocinas nos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos e magros com tumor de mama

Tabela 1: Protocolo de soluções para Western Blotting para quantidade proporcional a dois géis

LISTA DE ABREVEATURAS

AA – ácido araquidônico

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

APC – célula apresentadora de antígeno

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CDIS – carcinoma ductal *in situ*

CL – corpúsculo lipídico

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

COX-3 – ciclooxigenase 3

DAG- diaglicerol

EC – ésteres de colesterol

EIA – Ensaio Imunoenzimático

HFD- “*High fat diet*” – dieta de ganho de peso

IMC – Índice de Massa Corporal

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IL-1 – “*Interleukin 10*” – Interleucina-1

IL-2 – “*Interleukin 10*” – Interleucina- 2

IL-4 – “*Interleukin 10*” – Interleucina- 4

IL- 10 – “*Interleukin 10*” – Interleucina-10

IL-12 – “*Interleukin 10*” – Interleucina- 12

IL-13 – “*Interleukin 10*” – Interleucina- 13

IL-18 – “*Interleukin 10*” – Interleucina- 18

IFN- γ – interferon gama

MCP-1 – Proteína Quimioatrativa de Monócitos/Macrófagos tipo 1

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MOI – *Multiplicity of infection* – patógeno por célula

NK – “*natural killer*” – células exterminadoras naturais

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGE₂ – prostaglandina E2

PVDF – Membrana de transferência de fluoreto de polivinildileno

RE – retículo endoplasmático

SFB – soro fetal bovino

TAB – tecido adiposo branco

TAG – triaglicerol

TAM – tecido adiposo marrom

TAMs – macrófagos associados a tumores

TGF- β – “*Transforming growth factor beta*” – Fator transformador de crescimento beta

Th – células T “*helper*” - auxiliares

TLR-2 – “*Toll like receptor*” – Receptor tipo Toll-2

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Obesidade e câncer.....	16
1.2 Câncer e inflamação.....	21
1.3 Mediadores lipídicos, corpúsculos lipídicos e inflamação.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. HIPÓTESE.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo geral.....	35
4.2 objetivo específico.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1 Animais.....	36
5.2 Delineamento experimental.....	36
5.3 Indução da obesidade.....	37
5.4 Indução do tumor de mama e eutanásia.....	37
5.5 Obtenção do lavado peritoneal e do tecido adiposo.....	38
5.6 Estímulo com <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	38
5.7 Contagem de corpúsculos lipídicos.....	39
5.8 Dosagem de citocinas, adipocinas e eicosanóides.....	39
5.9 Western Blotting.....	39
5.10 Análise estatística.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6.1 Efeito da dieta hiperlipídica no ganho de peso dos animais.....	41
6.2 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção por BCG e <i>T. cruzi</i>	43
6.3 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de PGE ₂ e na expressão de COX-2 em macrófagos durante infecção por BCG e <i>T. cruzi</i>	45

6.4 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de leptina e adiponectina em macrófagos durante infecção por BCG e <i>T. cruzi</i>	48
6.5 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de citocinas em macrófagos durante infecção por BCG e <i>T. cruzi</i>	50
7. DISCUSSÃO.....	52
8. CONCLUSÃO.....	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A habilidade em estocar a energia excedente na forma de tecido adiposo foi uma estratégia adaptativa útil que permitiu aos ancestrais sobreviverem em períodos de privação alimentar. Atualmente, esse traço evolutivo do metabolismo humano, quando associado à elevada ingestão calórica e à relativa falta de atividade física, resulta num fenótipo complexo que é a obesidade (FLEGAL et al, 2010).

Sobrepeso e obesidade são classificados através do índice de massa corporal (IMC), sendo considerados adultos em sobrepeso aqueles com IMC maior que 25 enquanto que obesos aqueles com IMC acima de 30 (OMS, 2013).

A obesidade é um problema de saúde pública que atinge proporção epidêmica mundial (LOPES, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 foi confirmado mais de dois bilhões de casos de obesidade, destes, aproximadamente 300 milhões de mulheres. No Brasil, estudos divulgados em 2014 por Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) indicaram que em 2013, 50,8% dos brasileiros estavam acima do peso ideal (Figura 1) e que, destes, 17,5% estavam obesos (Figura 2). Esses resultados ultrapassam a média de crescimento da primeira edição, em 2006, quando a proporção de pessoas acima do peso era de 42,6% e de obesos era de 11,8%. A OMS ainda estima que em 2015 sejam 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso e 700 milhões de obesos.

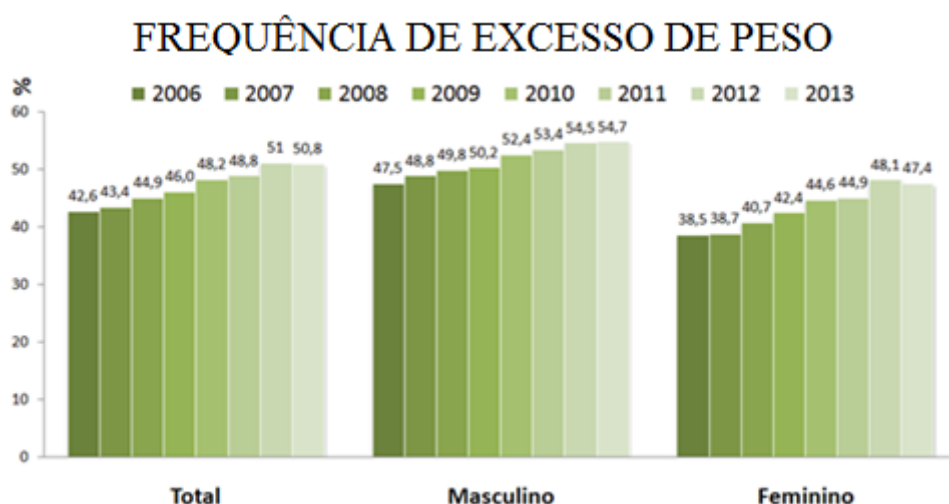


Figura 1: Frequência de excesso de peso no Brasil de 2006 a 2013 em porcentagem. Fonte: Conselho Nacional de Secretários da Saúde (CONASS)

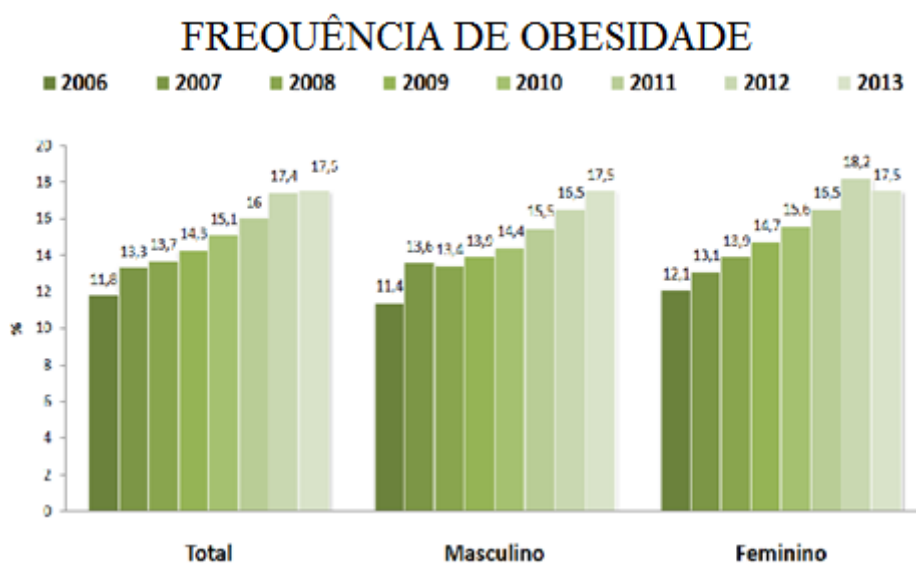


Figura 2: Frequência de obesidade no Brasil de 2006 a 2013 em porcentagem. Fonte: Conselho Nacional de Secretários da Saúde (CONASS)

1.1 OBESIDADE E CÂNCER

A obesidade representa um importante fator de risco para o aparecimento de outras doenças. Estudos demonstram que, proporcionalmente ao aumento do peso, segue o aumento dos níveis de gordura no sangue, glicemia e aumento da pressão arterial, além do aparecimento de doenças responsáveis pelo aumento das taxas de mortalidade e da diminuição da expectativa e da qualidade de vida, como diabetes, hipertensão arterial, hiperlipidemia, coronariopatias, doenças articulares e cânceres (GASTROMED, 2014).

As comorbidades associadas à obesidade são, em grande parte, atribuídas à inflamação crônica, uma característica metabólica das condições de obesidade. Como consequência do aumento no tamanho dos adipócitos nessa condição fisiopatológica, há necrose dessas células e os sinais gerados pela inflamação permitem a infiltração de macrófagos nos tecidos alvos (CINTI et al, 2005). A inflamação crônica age como fator de regulação da promoção e progressão tumoral através de vários mecanismos como a aceleração da proliferação celular, evasão da apoptose e aumento da angiogênese e da metástase (AGGARWAL et al, 2006).

O câncer e a obesidade são duas das principais epidemias globais da atualidade. Quando se encontram num mesmo indivíduo, os efeitos são nocivos: a obesidade é o segundo maior fator de risco para o câncer, perdendo apenas para o tabagismo (RAMOS, 2012; TABACK, 2014).

Diversos estudos indicam que, para cada 5kg/m² de aumento do IMC, observa-se um aumento de 12% na incidência do câncer (TABACK, 2014). Além disso, alguns estudos já mostraram uma relação mais clara em tumores que expressavam receptores de estrogênio e progesterona em mulheres na pós-menopausa. Sendo assim, o aumento da incidência do câncer de mama em mulheres obesas pode ser atribuído à maior síntese de estradiol, o principal agente promotor do câncer de mama (TABACK, 2014).

Em termos etiológicos, a obesidade é uma doença multifatorial caracterizada não só pelo aumento da massa do tecido adiposo, mas também pela ocorrência de um processo inflamatório crônico relacionado à grande infiltração de células mononucleadas nos adipócitos (WELLEN E HOTAMILISGIL, 2003; HOTAMILISGIL et al, 2010). Isso ocorre porque o tecido adiposo está interligado com o sistema imune inato, no qual os adipócitos compartilham algumas propriedades importantes como a produção de citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2001; HOTAMILISGIL et al, 2003). Sendo assim, nos estados obesogênicos ocorre expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que quando ativadas recrutam células do sistema imune como monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos para o tecido adiposo, desenvolvendo um processo inflamatório local e por esse motivo a obesidade é caracterizada como uma doença inflamatória crônica de baixo grau, resultando na ativação do sistema imune inato e adaptativo (RECH et al, 2007; PRADO et al, 2009; HAGITA et al, 2011; HELLMANN et al, 2011; ZALESIN et al, 2011).

O tecido adiposo é considerado um tecido conjuntivo especializado que estoca energia na forma de lipídeo. Dois tipos de tecido adiposo com propriedades funcionais distintas são descritos em mamíferos, como tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM), ambos envolvidos no balanço energético, porém, o TAM é especializado na dissipação da energia na forma de calor durante a termogênese, enquanto o TAB é o principal reservatório energético estocando lipídeos na forma de triagliceróis. Constituído por pré-adipócitos e adipócitos, células endoteliais que formam uma extensiva vasculatura, células mesenquimais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos (5 a 10%) (BERG E SCHERER, 2005).

O TAB expressa e secreta a proteína quimioatrativa de macrófagos e monócitos 1 (MCP-1), que recruta essas células para locais de inflamação. A hipertrofia dos adipócitos modifica o perfil de secreção e liberação de adipocinas, aumentando a secreção de MCP-1 que, por sua vez recruta macrófagos dando início a um estado pró-inflamatório (GUILHERME et al, 2008; SCHIPPER et al, 2012). A expressão da MCP-1 no tecido adiposo e seus níveis circulantes estão aumentados em camundongos obesos e isso sugere que a MCP-1, ao mediar a infiltração de macrófagos naquele tecido, pode contribuir para as anormalidades metabólicas relacionadas a obesidade (WEISBERG et al, 2003; SCHIPPER et al, 2012).

Diferentes subtipos de macrófagos estão envolvidos na inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade. Macrófagos que se acumulam no tecido adiposo de camundongos magros são principalmente M2 ou alternamente ativados, enquanto que no obeso são M1 ou classicamente ativados (LUMENG, BODZIN e SALTIEL, 2007).

Macrófagos do tecido adiposo magro, ou M2, exibem característica alternativa com maior produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10, IL-1 e TGF- β , que são ativados por IL-4 e IL-13. Em contraste, a expansão do tecido adiposo conduz hipertrofia dos adipócitos e liberação de IFN- γ , que induz o recrutamento e ativação de macrófagos M1 pela diminuição na produção de IL-10 e aumento de TNF- α (Figura 3). Esse recrutamento ocorre porque o tecido adiposo obeso expressa altos níveis de MCP-1 e moléculas de adesão (KALUPAHANA, 2012; GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

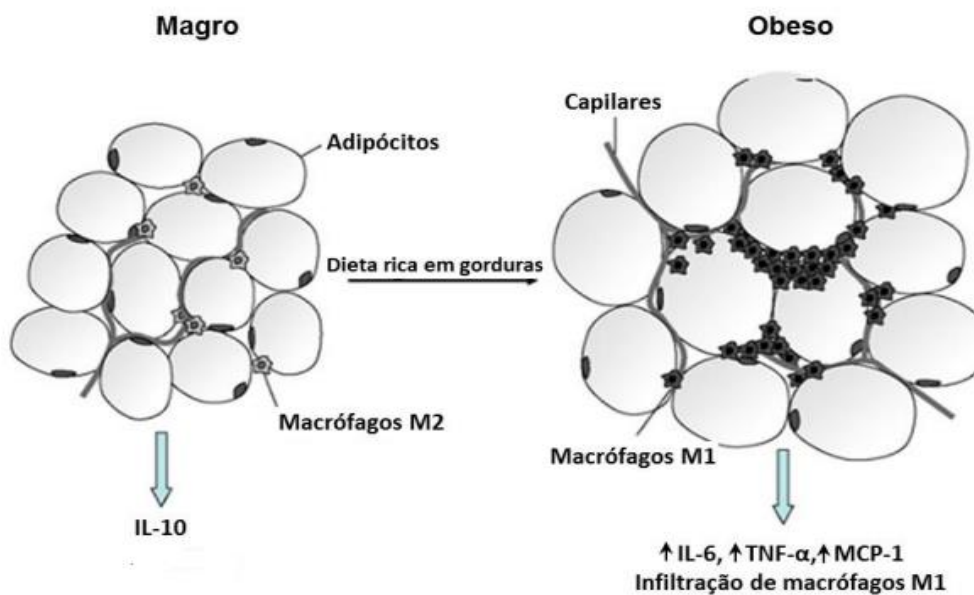


Figura 3: Mudanças induzidas pela obesidade na infiltração e polarização de macrófagos. Adaptado de Galic, Oakhill e Steinberg (2010)

Estudos animais mostram que durante o desenvolvimento da obesidade há um aumento de fatores angiogênicos produzidos pelos macrófagos para compensar a expansão do tecido adiposo. Essa estimulação interfere no ganho de peso, que diminui a tensão dos vasos, ocasionando uma diminuição dramática na vascularização, resultando em hipóxia, no qual a diminuição de oxigênio levará ao recrutamento de macrófagos pela MCP-1, desenvolvendo o processo inflamatório (HOTAMISGIL et al, 2003; CARVALHO et al, 2006; ORTIZ, 2007; GRAÇA et al, 2010).

A inflamação também ocorre em resposta ao desenvolvimento de um tumor, e, embora útil na luta contra o tumor, pode também contribuir para o processo tumorigênico. De fato, muitos cânceres surgem de sítios de infecção ou irritação e inflamação crônica (CARVALHO, 2013).

Sabe-se que as células cancerígenas aproveitam da deficiência do mecanismo de reparação diante da inflamação para se disseminar. Sendo assim, essa dupla face da inflamação que seria prevista para garantir a reparação tecidual passa a sofrer mudanças e a colaborar com o crescimento de uma lesão cancerígena, produzindo exageradamente as mesmas substâncias inflamatórias que desempenham o papel natural de reparação, como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, o que favorece a multiplicação da célula tumoral (BARRETO et al, 2011). Sendo assim, o processo que permite ao sistema imune reparar as lesões e destruir agentes agressores é desviado em

favor da célula tumoral e a inflamação permite que as células malignas se infiltrem nos tecidos e alcancem a corrente sanguínea e linfática, disseminando-se. Além disso, a apoptose sofre bloqueio e o tumor ganha tamanho (BARRETO et al, 2011).

A presença de células inflamatórias e de mediadores inflamatórios nos tecidos tumorais, no remodelamento tecidual e na angiogênese são características marcantes dessa relação (PORTA et al, 2009) e, embora essas células possuam a habilidade de prevenir o estabelecimento e a expansão tumoral, evidências indicam que em lesões malignas, as células inflamatórias adquirem funções de suporte ao crescimento e disseminação tumoral, sugerindo que o próprio processo inflamatório promova um microambiente propício ao desenvolvimento de tumores malignos (CARVALHO, 2013).

Além disso, o tecido adiposo é considerado como um órgão endócrino, pela sua importante função de armazenar energia. O excesso de energia consumida é convertido em triagliceróis sob ação da insulina, enquanto que em situações de restrição energética os estoques de energia são rapidamente mobilizados sob influencia hormonal (GUIMARÃES et al, 2007).

O tecido adiposo intervém no metabolismo dos esteróides sexuais através da aromatização de hormônios pela aromatase P450, que cataliza a conversão de androstenediona em esterona e de testosterona em estradiol. Estas vias contribuem significativamente para os níveis de esteroides sexuais na mulher, sobretudo na pós-menopausa (PRINS, 2002; REHERAN, 2008). É uma enzima presente em diversos tecidos, dentre eles o tecido adiposo e importante na produção de estrogênios. Quando expressa em excesso nos quadros obesogênicos, apresenta um importante fator de risco para o câncer, principalmente o câncer de mama (CLELAND, 1985; PRINS, 2002; SAAD et al, 2002; TABACK, 2014). Após a menopausa, caracterizada pela insuficiência ovariana, os andrógenos que passaram a ser produzidos pelo córtex supra-renal são metabolizados nos tecidos periféricos pela aromatase, e por esse motivo, a maior produção hormonal requer uma maior demanda enzimática para o metabolismo, aumentando a produção de estrogênio e contribuindo com a progressão tumoral (SAAD et al, 2002). Atualmente têm-se utilizado inibidores de aromatase no tratamento de câncer de mama hormônio-dependente especialmente em mulheres na menopausa, agindo no bloqueio dessa conversão hormonal (SAAD et al, 2002; TABACK, 2014).

Outro fator endócrino importante no tecido adiposo é a leptina, produzida quase que exclusivamente no tecido adiposo (PRINS, 2002; TRAYHURN, 2005; MITCHELL

et al, 2005) e que pode contribuir para o aumento do risco do câncer de mama (XAVIER et al, 2012). Estudos anteriores sugeriram que a leptina age como fator de sinalização do tecido adiposo para o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético, participando então, da homeostase do peso corporal (ALAAS, 1995; XAVIER et al, 2012).

A leptina é um hormônio secretado pelo adipócito e é um mediador central do controle do apetite e da homeostasia energética (ZHANG et al, 1994). O alvo fisiológico mais importante para a ação desse hormônio é o sistema nervoso central, sendo o receptor de leptina (OBR) também expresso em tecidos periféricos, em concentrações reduzidas (COHEN et al, 2001; MOSCHOS et al, 2002; XAVIER et al, 2012). Pesquisas recentes apontam que a leptina pode contribuir para o crescimento de tumores, como o de mama, pelo aumento da proliferação e sobrevivência das células tumorais (XAVIER et al, 2012).

1.2 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Sabe-se que os seres vivos são compostos por células, as quais o conjunto dá origem aos tecidos e órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997; INCA, 2001; INCA, 2014). Essas células apresentam genes de regulação de crescimento, no qual maturam até certo ponto e depois morrem. Porém, algumas podem escapar do processo regulatório, crescendo e se dividindo descontroladamente, designando uma neoplasia, que pode ser benigna ou maligna. Benignos quando são autolimitantes e não se propagam entre os tecidos adjacentes e malignos quando apresentam crescimento ilimitado, podendo propagar para tecidos vizinhos, sendo este o fenômeno da metástase. Sendo assim, o câncer é um processo patológico que começa quando uma célula anormal é transformada por mutação, forma um clone e se prolifera ignorando os sinais de regulação e adquirindo características invasivas (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001; INCA, 2014).

A transformação começa com uma célula que, sofrendo lesão genética, forma clone e expande (ABBAS et al, 2005). Os proto-oncogenes, que são genes que codificam proteínas reguladoras essenciais para a proliferação celular normal, quando mutados originam os oncogenes (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

A transformação para oncogene se dá pela alteração na estrutura do gene, resultando na síntese de uma oncoproteína, que exerce uma função aberrante ou por

alteração na regulação da expressão gênica, resultando na produção aumentada da proteína de promoção do crescimento celular (HJALGRIM, 2003). A partir desse momento inicia-se a codificação das oncoproteínas, que são semelhantes às proteínas normais, mas destituídas de elementos reguladores importantes e sua produção é independente de fatores de crescimento ou sinais externos (HJALGRIM, 2003).

Além disso, o organismo humano encontra-se exposto a múltiplos fatores carcinogênicos e, independentemente da exposição à carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea (LOEB e HARRIS, 2008; INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo considerado problema de saúde pública. Cerca de 1,67 milhões de novos casos foram esperados para o ano de 2012, representando 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Suas taxas de incidência variam e encontram-se maiores na Europa Ocidental (96/ 100 mil) e as menores na África Central e na Ásia Oriental (27/ 100 mil) (INCA, 2012). Estima-se que nos EUA uma a cada oito mulheres ao atingir 80 anos irá desenvolver o câncer de mama e que esta seja a segunda principal causa de morte associada a câncer em mulheres, sendo a maioria decorrente de doença metastática não controlada (DESANTIS et al, 2014).

Nas últimas décadas ocorreu expressivo aumento da incidência e mortalidade do câncer de mama em todo o mundo. No Brasil, representa a neoplasia maligna de maior incidência e mortalidade que acomete o sexo feminino. Em 2006 foi estimado o aparecimento de 48.930 casos da neoplasia em todo o Brasil e para 2014 foram esperados 57.120 novos casos, correspondendo a um aumento de 20% (Figura 4) e com risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2013).



Estimativa do número de casos novos, em mulheres, Brasil, 2014

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%
Cavidade Oral	4.010	1,5%
Pele Melanoma	2.930	1,1%
Esôfago	2.770	1,0%
Bexiga	2.190	0,8%
Linfoma de Hodgkin	880	0,3%
Laringe	770	0,3%
Todas as Neoplasias sem pele*	190.520	
Todas as Neoplasias	274.230	



*Todas as neoplasias exceto pele não melanoma
 Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013
 MS/INCA/CGPV/Divisão de Vigilância e Análise de Situação

Figura 4: Estimativa para o ano de 2014 das taxas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária. Fonte: INCA.

A mama de uma mulher adulta é constituída por glândulas produtoras de leite na frente da parede torácica. Cada mama assenta no músculo peitoral maior, suportado por ligamentos do esterno e envolve também vasos linfáticos, na qual transportam a linfa, terminando nos gânglios linfáticos (Figura 5) (SEELEY et al, 2005; ROCHE et al, 2013; STOPECK e ALISON, 2014).

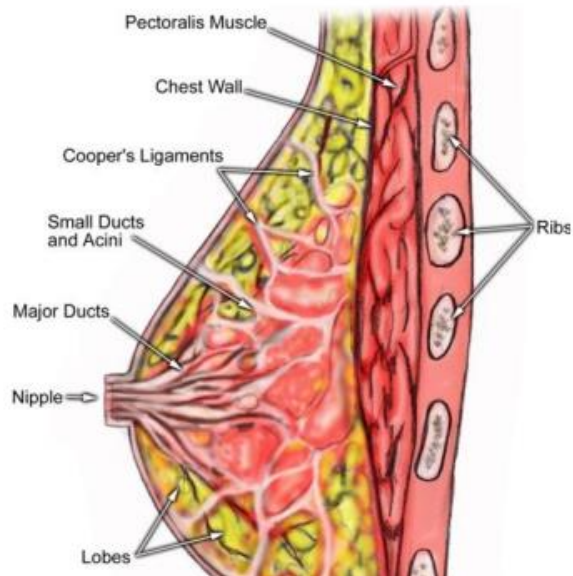


Figura 5: Estrutura anatômica da mama. Adaptado de STOPECK e ALISON (2014)

O cancro da mama tem origem de uma disfunção celular, que se caracteriza pelo processo de multiplicação e crescimento desordenado das células epiteliais (STOPECK e ALISON, 2014).

A maioria das neoplasias malignas da mama é denominada adenocarcinomas, pois têm origem nos ductos ou nos lóbulos. Os dois tipos mais frequentes são o carcinoma ductal e o lobular (National Institute Cancer, 2012), sendo o carcinoma ductal in-situ (CDIS) é o mais frequente, caracterizado por ser não invasivo e sem capacidade para metastizar (HARTMANN et al, 1997).

Apesar de as células tumorais derivarem de células do hospedeiro, os tumores provocam respostas imunológicas (ABBAS et al, 2011). Paul Ehrlich foi um dos primeiros a defender que o sistema imune reprime o crescimento de carcinomas (DUNN, 2002). As novas descobertas no campo da imunologia confirmam essa hipótese, ao mesmo tempo em que lançam a idéia de que o sistema imune pode, além de proteger, promover o crescimento de tumores com imunogenicidade reduzida (DUNN, 2002).

Estudos histopatológicos tumorais têm demonstrado a forte infiltração de leucócitos dentro e nas adjacências dos tumores. Nos cânceres, estas células de defesa são recrutadas em resposta ao tumor, em decorrência de processos inflamatórios pré-câncer ou por substâncias produzidas pelas próprias células tumorais (VAKILLA, 2004; ABBAS et al, 2011).

O reconhecimento de uma célula tumoral pelo sistema imune pode se processar de maneiras distintas, no qual exige a participação de elementos da imunidade inata e adaptativa. Em se tratando de imunidade inata, o controle tumoral é feito, sobretudo, por meio de citocinas, principalmente IFN- γ , macrófagos e células NK. Quando o sistema imune é estimulado pela primeira vez, há ativação e recrutamento de células inflamatórias e linfócitos através da liberação de citocinas e quimiocinas específicas (SHI et al, 2003).

Infiltrados de macrófagos são frequentemente observados nos tecidos neoplásicos, e quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias são ativados e podem destruir células tumorais através da produção de TNF- α , induzindo morte por apoptose, naturalmente seguido de fagocitose dos corpos apoptóticos e subsequente criação de processo inflamatório, que requer a presença de citocinas como TNF- α , IL-2, IL-12 e IL-18 (KLIMP et al, 2002; LIN et al, 2001).

Nas últimas décadas, o papel dos macrófagos no crescimento tumoral tem sido estudado, sendo os macrófagos capazes de exercer importante papel na resposta inflamatória antitumoral (KLIMP et al, 2002; COUSSENS & WERB, 2002).

Como mencionado anteriormente, os macrófagos podem se modificar por meio de diferentes estímulos e então se diferenciar em macrófagos com diferentes funções, no qual a via clássica é caracterizada pela alta capacidade de apresentar antígenos, com alta produção de IL-12 e alta produção de óxido nítrico (NO) (MANTHOVANI, 2004). Sugere que essa via leve à ativação de macrófagos efetores potentes que eliminam microorganismos e células tumorais e produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, as quais já foram citadas (OHRI et al, 2009; MA et al, 2010).

Após a migração dessas células para os sítios neoplásicos, ocorrem mudanças nas suas propriedades fenotípicas e genotípicas (SHURIN e SALTER, 2009). Estudos já mostraram a presença de diferentes genes expressos em macrófagos associados aos tumores (TAMs), que podem produzir menores quantidades de NO, prejudicando sua atividade tumoricida (BASKIC et al, 2001). Os TAMs fazem parte do microambiente tumoral em torno da massa, sendo componente chave desse microambiente, além da presença de fibroblastos e outras células migratórias hematopoiéticas (MANTOVANI, 2011).

O reconhecimento e lise das células tumorais também se dão por células NK, que podem ser ativadas por citocinas, como IL-12 e IFN- γ , desencadeando lise celular através da liberação de perforinas e granzimas (KAPLAN, 1998; DUDLEY et al, 2002).

Além disso, sabe-se que os adipócitos produzem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII). Elevados níveis de leptina provocados pela hipertrofia excita as células CD4⁺ a produzir IFN- γ , que por sua vez estimula a polarização de macrófagos M2 para M1, caracterizando o perfil pró-inflamatório (KAPLAN, 1998; DUDLEY et al, 2002) (Figura 6).

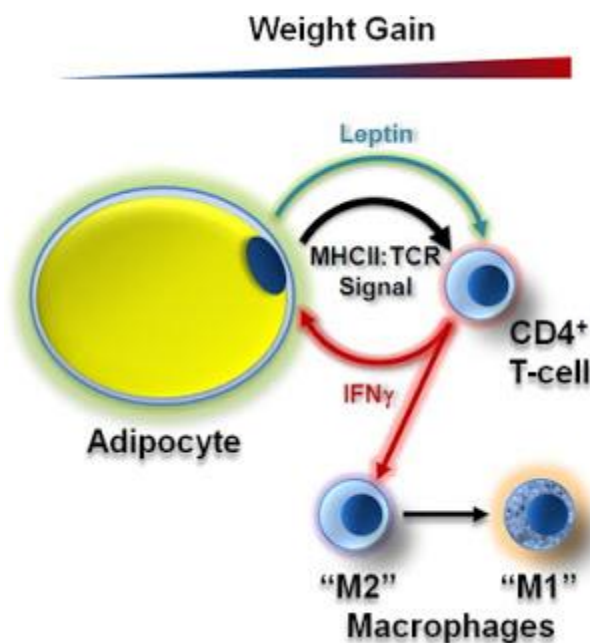


Figura 6: Esquema de ativação dos macrófagos pela apresentação de antígenos. Adaptado de Dudley et al (2002)

Adicionalmente, a IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas, possui participação importante na fase inicial da ativação de células NK estimulando-as a exercerem citotoxicidade e a produzirem mais IFN- γ que, por sua vez, aumenta o potencial tumoricida dos macrófagos (ENZLER et al, 2003; DE VISSER et al, 2006).

Em seguida, são produzidos os IFNs- γ , que ativam as APCs, especialmente as células dendríticas, responsáveis pela iniciação da imunidade adquirida (KAPLAN, 1998).

As células dendríticas são as APCs mais eficientes quando comparadas a linfócitos B e macrófagos, sendo capazes de apresentar peptídeos ligados ativando células T CD4⁺ e CD8⁺. As células T auxiliares CD4⁺ reconhecem o antígeno pelo MHCII e produzem IFN- γ e os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ reconhecem antígenos apresentados pelo MHCI e desenvolvem grânulos citoplasmáticos ligados a membrana contendo proteínas, incluindo perforinas e granzimas, cuja função é destruir outras células. Além disso, esses linfócitos são capazes de secretar IFN- γ e TNF- α atuando na

ativação de macrófagos (DUDLEY et al, 2002; GUERMONPREZ et al, 2003; HEATH et al, 2004; ABBAS, 2007; STEINMAN, 2007; LIN et al, 2008). Em conjunto, esses dados demonstram a intrínseca relação entre inflamação, ativação do sistema imune e desenvolvimento de células cancerígenas.

1.3 MEDIADORES LIPÍDICOS, CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E INFLAMAÇÃO

Os mediadores lipídicos desempenham um papel importante nos estágios iniciais da inflamação, bem como nas etapas de resolução do processo inflamatório. Após a lesão tecidual, a produção de prostaglandinas e leucotrienos está associada ao processo de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento celular de neutrófilos, gerando uma resposta pró-inflamatória, característica dos primeiros estágios da resposta inflamatória aguda. Já nos estágios tardios, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos recrutados para o sítio inflamatório induz uma mudança na categoria de mediadores lipídicos para um perfil antiinflamatório e conseqüentemente a redução no influxo de células ao local da lesão (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

O metabolismo alterado de lipídeos nas células do cancro envolve a modulação de múltiplas enzimas lipogênicas, tais como ciclooxigenases e prostaglandinas (ACCIOLY et al, 2008).

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos formados a partir do ácido araquidônico (AA), presente na maioria das células como parte integrante da reserva celular de fosfolipídios (OLIVEIRA et al, 2006; NARD, 2007).

A exposição da célula a um determinado estímulo ativa a enzima Fosfolipase A₂ existente na membrana celular. Após a sua liberação, o ácido araquidônico é metabolizado por dois sistemas enzimáticos, um pela ação da lipooxigenase, produzindo leucotrienos, outro pela ação da ciclooxigenase (COX), que após a inserção de uma molécula de oxigênio no ácido araquidônico promove a produção de PGG₂, que é rapidamente convertida em PGH₂, por ação da COX, que, por sua vez se transforma em outras PGs (PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂), assim como em tromboxano e prostaciclina (Figura 7) (OLIVEIRA et al, 2006; NARD, 2007).

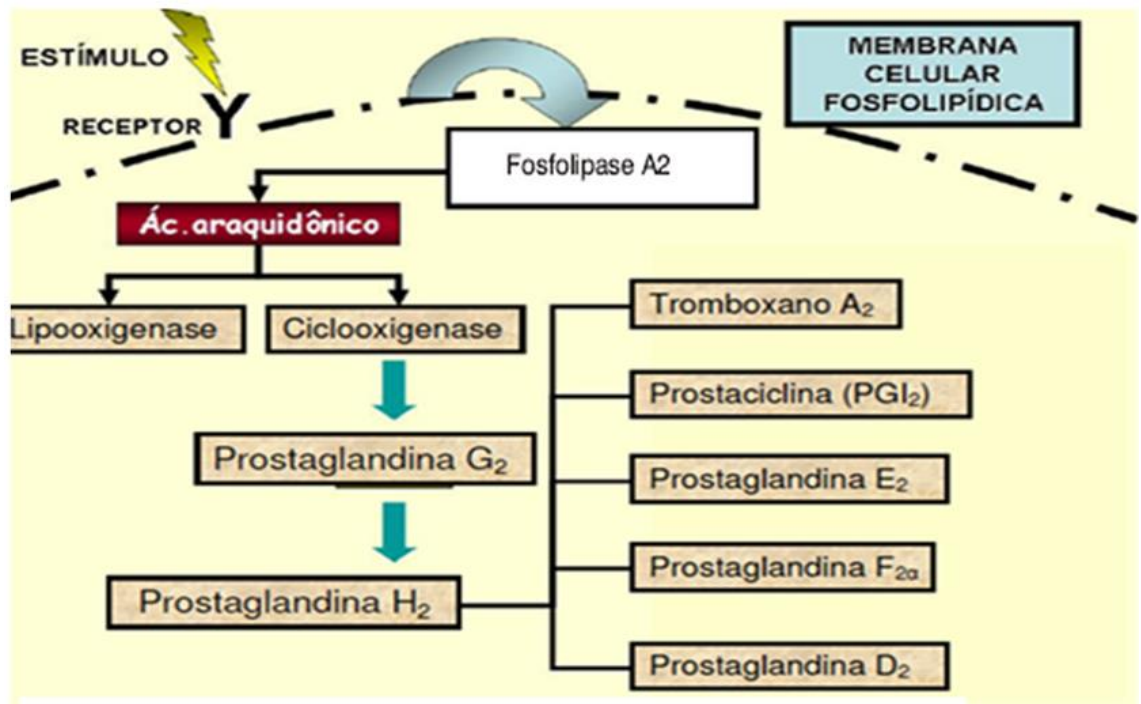


Figura 7: Esquema do metabolismo do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase. Adaptado de Calderon (2005)

Sabe-se que há pelo menos dois tipos de ciclooxigenases que exercem no organismo diferentes funções fisiológicas: A COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa de forma constitutiva em muitos tecidos, sintetizando as PGs que regulam a função celular. A inibição da COX-1 conduz a efeitos colaterais bem conhecidos, como as úlceras gástricas e a toxicidade renal (SOUZA et al, 2001; WANG et al, 2006). Sendo assim, as PGs modulam funções fisiológicas nesses órgãos, mantendo o aporte sanguíneo no tecido renal, evitando quadros de isquemia, e no trato gastrointestinal preservando a integridade do estômago pela produção de PGs gastroprotetoras que impedem a isquemia dos vasos gástricos e células como as plaquetas (MURRAY & BRATER, 1993; DAVIES, 1995).

A COX-2 não é encontrada nas células em repouso em quantidade significativa, mas sua expressão é aumentada significativamente nos estados inflamatórios (BEAM et al, 2003; NARD, 2007). A COX-2 parece atuar na carcinogênese de várias formas, incluindo efeitos sobre a apoptose, proliferação celular, imunomodulação, agressão do tumor, neoangiogênese e invasão tumoral (BRAMBILLA, 2006; OLIVEIRA et al, 2006).

Além das ciclooxigenases citadas, a COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, vem sendo estudada e já se sabe que é uma ciclooxigenase encontrada

principalmente no córtex cerebral (CHANDRASEKHARAN et al, 2002; KIS et al, 2005).

Nas últimas décadas estudos clínicos experimentais e epidemiológicos têm ligado o desenvolvimento e progressão das neoplasias com a presença da COX-2 nas células tumorais humanas (BEAM et al, 2003).

A COX-2 é considerada um ponto em comum entre inflamação e câncer. Em resposta à vários estímulos externos, como citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos bacterianos e radiação UV, a expressão dessa enzima torna-se elevada, levando à proliferação celular, supressão da apoptose e indução de angiogênese e metástase (BOL et al, 2002; CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004; MILLANTA et al, 2006; KUNDU, SURH, 2008). Além disso, a atividade catalítica da COX-2 resulta na produção e potencialização de danos do DNA por radicais livres. A combinação desses efeitos contribui para que ocorram lesões permanentes no DNA, justificando a hipótese dos processos inflamatórios levarem ao aparecimento do câncer (NARDI, 2007).

Muitas neoplasias são associadas com a supressão da resposta do sistema imune por elevados níveis de PGE₂, formada pela atividade da COX-2. Ocorre supressão na proliferação de linfócitos B e T e formação de células Natural Killer (NK) (NARDI, 2007).

Além disso, têm-se como estruturas de localização de enzimas formadoras de eicosanóides, a formação de gotículas de gorduras no citoplasma da célula, conhecidas como Corpúsculos Lipídicos (CLs) (D'ÁVILA, 2006; BOZZA et al, 2007; D'ÁVILA, 2008).

Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas compostas por triglicerídeos e ésteres de colesterol, sendo também depósitos intracelulares de AA, que pode ser metabolizado para a formação de eicosanóides (ACCIOLY et al, 2008). Dentre estes eicosanóides, a PGE₂ é o de maior relevância, sendo considerado um potente mediador capaz de modular a mobilidade, sobrevivência e proliferação celular e angiogênese, que são processos importantes na restauração da homeostase do tecido epitelial após injúria (ACCIOLY et al, 2008).

Os corpúsculos lipídicos podem ser observados em diversos tipos celulares e recebem diversas denominações na literatura, como gotas lipídicas (“*lipid droplets*”) quando presentes em adipócitos, glóbulos lipídicos (“*lipid globules*”) quando presente

em células mamárias ou partículas lipídicas (“*lipid bodies* ou *particles*”) em várias células animais e fúngicas (MURPHY, 2001; MARTIN E PARTON, 2005).

Com o uso da fixação apropriada e coloração com tetróxido de ósmio ou *sudan black*, os corpúsculos são claramente visualizados tanto na microscopia de luz como na eletrônica, sendo antigamente confundidos com vacúolos (MURPHY, 2001; PACHECO, 2002; MARTIN E PARTON, 2005). É possível identificar estas organelas em microscopia de luz utilizando fixação apropriada com paraformaldeído, glutaraldeído (DIDONATO E BRASAEMLE, 2007), tetróxido de ósmio (WELLER et al, 1991; BOZZA et al, 1996) ou *Oil red* (GREENSPAN et al, 1985) (Figura 8).

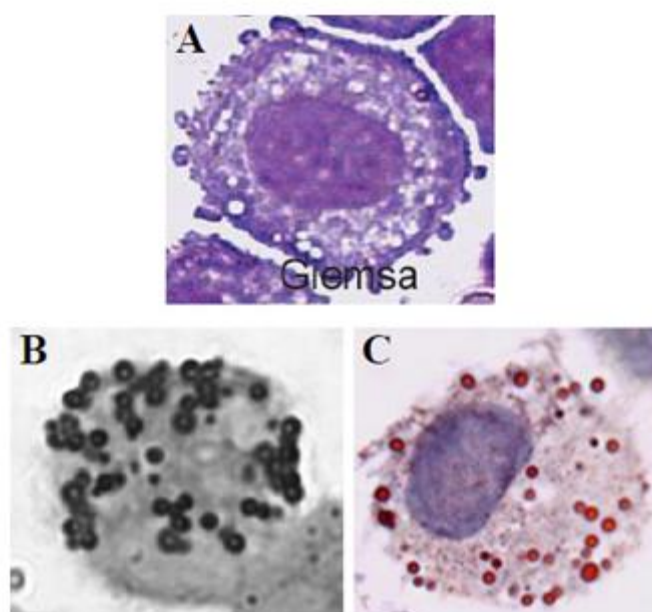


Figura 8: Corpúsculos lipídicos em macrófagos ativados. Microscopia de luz (A-C), após coloração com May-Grunwald Giemsa (A), tetróxido de ósmio (B), oil-red (C). Adaptado de Bozza et al, 2007 e D'Ávila et al (2008). Em A, os corpúsculos lipídicos são vistos como imagem negativa, em B e C como estruturas arredondadas no citoplasma das células.

Em contraste com outras organelas citoplasmáticas, os corpúsculos lipídicos são envoltos por uma única camada de fosfolipídeos, apresentando um centro rico em lipídeos neutros, como triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e éster de colesterol (EC), com densidade eletrônica variada, circundado por uma linha eletrodensa medindo cerca de 2-2,5 nm de espessura (MURPHY, 2001; TAUCHI-SATO et al, 2002). Apresentam variações em seu tamanho, desde organelas recém-formadas medindo 50

nm de diâmetro até 200 nm diâmetro, encontrados em adipócitos maduros (MURPHY E VANCE, 1999; MURPHY, 2001).

A biogênese de corpúsculos lipídicos vem sendo estudada, porém ainda é pouco compreendida. A hipótese mais aceita atualmente é que são formados a partir do retículo endoplasmático (RE). Com a síntese de triacilglicerol e ésteres de colesterol pelas enzimas acil CoA-diacilglicerol aciltransferase e acilCoA-colesterol aciltransferase no RE, há um acúmulo destes lipídeos entre as camadas citosólicas fosfolipídicas da membrana, gerando um brotamento para formar uma organela independente, limitada por uma monocamada de fosfolídeos e proteínas (Figura 9) (ROBENEK et al, 2004).

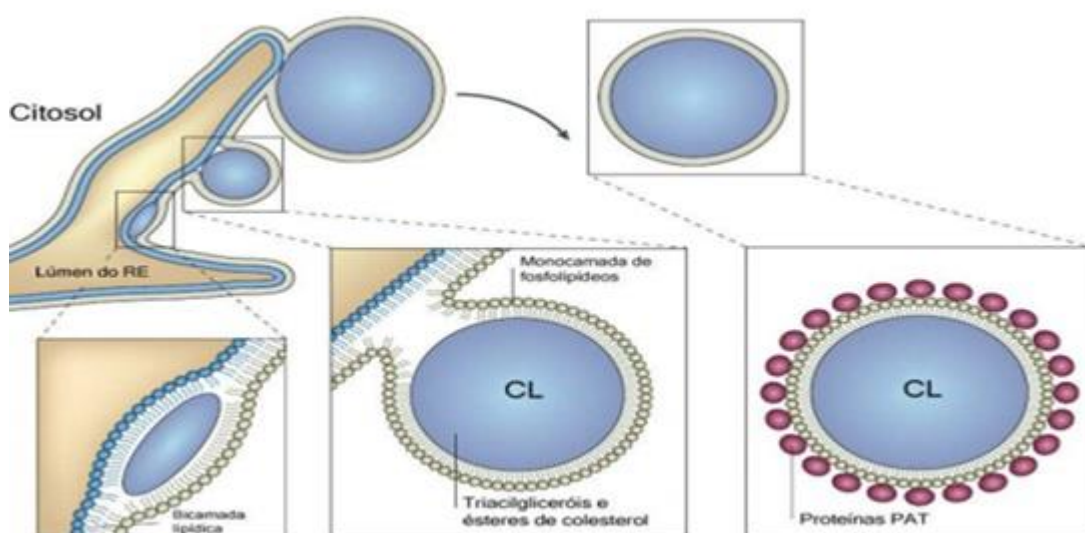


Figura 9: Biogênese do corpúsculo lipídico. Adaptado de Martin e Parton (2006)

Além disso, vários estudos já demonstraram que citocinas e quimiocinas ativam vias de sinalização intracelular levando a formação de CLs, como MCP-1 e TGF- β (BOZZA et al, 1998; MELO et al, 2001; MELO et al, 2002; PACHECO et al, 2007).

A mobilidade de corpúsculos lipídicos também tem sido observada em processo de fagocitose. Essas estruturas têm sido encontradas próximas à fagossomos em macrófagos, sugerindo interação entre essas organelas (D'AVILA et al, 2006).

Por muito tempo essas organelas foram representadas como depósitos inertes de gordura e sítios de transporte de lipídeos. Em síntese, corpúsculos lipídicos eram descritos como sítios de estocagem, e metabolicamente inativos em termos de funções celulares. Atualmente são consideradas organelas dinâmicas e funcionalmente ativas.

Sugere-se o envolvimento de corpúsculos lipídicos nas mais variadas funções como, por exemplo, no metabolismo e tráfego de lipídeos, na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios (MURPHY, 2001; MARTIN E PARTON, 2006; BOZZA et al, 2007).

Diversos estudos têm levado a um novo conceito de que os corpúsculos lipídicos não são somente um estoque de lipídeos neutros do tecido adiposo, mas uma organela multifuncional presente em vários tipos celulares (MURPHY, 2001; YAO et al, 2005). Atualmente sabe-se que em leucócitos, essas estruturas aumentam em tamanho e número nos processos inflamatórios e infecciosos, além de participar na sinalização e ativação celular, tráfego e metabolismo lipídico, bem como controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (BOZZA et al, 2009).

Especificamente nos leucócitos, os corpúsculos lipídicos estão presentes em situações normais, embora em pequeno número e tamanho e, como já citado, estas estruturas sofrem modificações morfológicas e funcionais notórias quando estes leucócitos são submetidos a diferentes processos que induzem ativação celular. A quantidade e proporção de lipídeos neutros presentes no núcleo dessas organelas são variáveis e dependem do tipo celular. Estudos demonstraram aumento no número e tamanho dos corpúsculos lipídicos de leucócitos obtidos de pacientes com distúrbios inflamatórios, como síndrome hipereosinofílica (BOZZA et al, 1998), síndrome da angústia respiratória aguda (TRIGGIANI et al,1995), doença de Chron (BEIL et al, 1995) e em infecções por vários agentes patogênicos, dentre eles *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium bovis* BCG, *M. leprae* etc (CHARRON et al, 2002; MELO et al, 2003; D`AVILA et al, 2006; BOZZA et al, 2007). Dentre essas doenças nosso grupo tem investigado a formação dessas organelas especialmente nas infecções causadas por BCG e *T. cruzi*.

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacilo de Koch) (FRIEDEN et al, 2003). É uma doença que causa cerca de 1,4 milhões de morte por ano, sendo constatado 8 milhões de novos casos, estando atrás apenas da AIDS na taxa de mortalidade por doenças infecciosas, de acordo com dados da OMS em 2013 (GALAGAN et al, 2013).

A doença de Chagas é uma zoonose que tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constitui um dos principais problemas médico-sociais brasileiros e um importante problema de saúde pública na América Latina. De acordo com a OMS, a prevalência é de 13 milhões de pessoas em 15 países,

com incidência anual de 200.000 casos (UNICEF, 2003). No Brasil estima-se que há cerca de três milhões de portadores (SILVA et al, 2010).

A resposta imune contra microorganismos intracelulares se inicia com o reconhecimento pelos receptores Toll Like-2 (TLR-2), que induz expressão do MCHI e II e com isso os macrófagos atraem, pela produção de quimiocinas, monócitos, linfócitos e neutrófilos inativados que não são suficientes para eliminar a bactéria. Começa então a se formar lesões granulomatosas formadas de células gigantes derivadas de macrófagos espumosos que decorrem de um acúmulo de lipídeos intracelular, armazenados em CLs desses macrófagos e outras células. O aparecimento dos macrófagos espumosos é uma observação patológica comum no granuloma tuberculoso, sendo o aspecto espumoso um reflexo do acúmulo intracelular de lipídeos estocados nos corpúsculos lipídicos (CARDONA et al, 2000). Além disso, a literatura demonstra que estes macrófagos espumosos e adipócitos podem ser reservatórios de longa duração para o *M. tuberculosis* (PEYRON et al, 2008).

No caso específico da infecção por micobactérias e *T cruzi*, a transformação do ácido araquidônico em PGE₂ pela COX2, parece favorecer a sobrevivência dos patógenos, e a supressão da produção de PGE₂ impede o seu crescimento (RANGEL MORENO et al, 2002; D'ÁVILA et al 2006; D'ÁVILA et al 2011; FREIRE-DE-LIMA et al, 2000). Com isso, a formação aumentada de corpúsculos lipídicos na infecção por micobactérias e protozoários, induz uma maior produção de PGE₂ derivada destas organelas, favorecendo a infecção (D'ÁVILA et al, 2012; BOZZA et al, 2009). Além disso, trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que no modelo experimental em camundongos, uma dieta rica em lipídios, bem como a estimulação com leptina, são capazes de causar a formação de corpúsculos lipídicos, PGE₂, e citocinas, como TNF- α e IL-6 (MAYA MONTEIRO et al, 2008), demonstrando o envolvimento do controle do metabolismo lipídico, e por consequência da obesidade, no processo inflamatório durante infecções.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma doença extremamente complexa que envolve uma série de interações entre fatores genéticos e ambientais. Com o objetivo de tratar e superar a obesidade surge a necessidade de desenvolver um profundo conhecimento das bases

celulares e moleculares sob a expansão do tecido adiposo em estados fisiológicos ou patológicos, que conduzem à obesidade.

Diante disso, sabendo da caracterização da obesidade como um quadro de inflamação de baixo grau crônica, contribuindo na formação de tumores malignos e tendo influência sobre a resposta à infecções por patógenos, uma vez que a síntese de eicosanoides é maior diante da inflamação e é induzida formação de corpúsculos lipídicos, o presente trabalho visa estudar a correlação do tumor de mama e obesidade na resposta inflamatória durante infecções por patógenos intracelulares, analisando a formação de corpúsculos lipídicos e a síntese de mediadores inflamatórios.

3. HIPÓTESE

Baseado em estudos anteriores do grupo, que mostraram que a infecção por *M. bovis* aumenta a quantidade de corpúsculos lipídicos em macrófagos, associado com um aumento na produção de PGE₂ (D'AVILA et al, 2008) e, ainda neste contexto, já demonstrado que durante a infecção por *T. cruzi* há um aumento na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos, também associada com a produção de PGE₂ no sítio inflamatório (MELO et al, 2003; SABBAN; WELLER, 2006; D'ÁVILA et al, 2011), investigamos a correlação desses agentes infecciosos na presença de um processo inflamatório intenso, caracterizado pela obesidade e pela presença de tumores de mama metastáticos.

Espera-se observar a potencialização da infecção nos animais obesos com tumor, relacionando com a resposta inflamatória na re-estimulação com os patógenos intracelulares, caracterizada pelo aumento de corpúsculos lipídicos e aumento de citocinas pró e/ou antiinflamatórias no grupo obeso, quando comparados com o grupo magro com tumor.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de tumores de mama na resposta do hospedeiro contra infecções por patógenos intracelulares, BCG e *T. cruzi*, tendo como alvo a análise de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores pró e antiinflamatórios por macrófagos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos do tecido adiposo e macrófagos peritoneais de animais com tumores obesos e magros, re-estimulados ou não com *M. bovis* e *T. cruzi*;

3.2.2 Investigar a produção de PGE₂ pelos macrófagos do tecido adiposo e macrófagos peritoneais de animais com tumores obesos e magros, re-estimulados ou não com *M.bovis* e *T.cruzi*;

3.2.3 Analisar a expressão da COX-2 em macrófagos do tecido adiposo e macrófagos peritoneais de animais com tumores obesos e magros, re-estimulados ou não com *M.bovis* e *T.cruzi*;

3.2.4 Analisar a produção de leptina e adiponectina pelos macrófagos do tecido adiposo de animais com tumores obesos e magros, re-estimulados ou não com *M.bovis* e *T.cruzi*;

3.2.5 Analisar a produção das citocinas, IL-10, TNF- α e TFG- β por macrófagos do tecido adiposo de animais com tumores obesos e magros, re-estimulados ou não com *M.bovis* e *T.cruzi*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas e peso entre 18 e 20g, obtidos do Biotério de Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, em conjunto com o grupo de pesquisa da Dra. Jacy Gameiro no laboratório de Imunologia, acondicionados em gaiolas de propileno, cobertas com cama de maravalha, dotadas de cochos para ração e local para mamadeira com água filtrada.

Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da UFJF, certificado pelo protocolo de nº 039/2012 – CEUA.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizado modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica. Os animais controles (magros) receberam dieta padrão. Para caracterizar o modelo de obesidade foi feito controle do peso e consumo da ração dos animais semanalmente, por 16 semanas (dados não mostrados).

Ao fim do período da dieta, os animais foram divididos em grupos de animais magros (controle) e obesos e todos os animais foram estimulados com 5×10^4 células de linhagem tumoral 4T1, concentração previamente definida por Kim e colaboradores (2011). Após 14 dias de crescimento tumoral, os animais foram eutanasiados para as seguintes análises: Contagem de corpúsculos lipídicos, dosagem de leptina, adiponectina, TNF- α , IL-10 e PGE₂ e Western-Blotting para COX-2 (Figura 10).

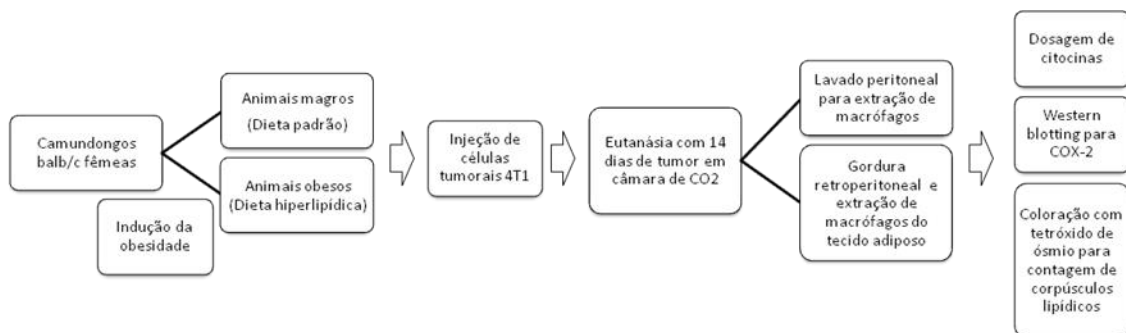


Figura 10: Esquema do delineamento experimental.

5.3 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Os animais controles foram alimentados com ração comercial padrão Nuvilab®, composta por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, calcário calcítico, fosfato bicalcoico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral aminoácido, sendo 10% advindas de lipídeos. O grupo dos animais obesos foi tratado com dieta rica em lipídeos (HFD, do inglês “*High fat diet*”), preparada no laboratório de Imunologia/UFJF. A ração é composta por amido de milho (57,75g), caseína (100g), amido de milho dextrinizado (66g), sacarose (50g), óleo de soja (20g), banha de porco (156g), celulose microfina (25g), mistura de minerais (17,5g), mistura de vitamina (5g), L-cistina (1,5g), bitartarato de colina (1,25g), sendo cada ingrediente cuidadosamente pesado e homogeneizado com auxílio de um multiprocessador (PHILLIPS WALITA), acondicionado em recipiente de plástico e congelado a -20°C até o momento da distribuição nas gaiolas. Os ingredientes foram adquiridos da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociência.

Em seguida os animais foram divididos em grupos de camundongos obesos e magros e alimentados por 16 semanas.

5.4 INDUÇÃO DO TUMOR DE MAMA E EUTANÁSIA

Foi realizado o inóculo da linhagem celular 4T1 na concentração de 5×10^4 células (KIM et al, 2011) no volume de 100uL por injeção intradérmica na mama superior esquerda. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ ao fim de 14 dias com tumor, tempo necessário para o desenvolvimento do processo inflamatório.

5.5 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL E DO TECIDO ADIPOSEO

Para a extração dos macrófagos peritoneais foi realizada lavagem peritoneal com PBS 1x gelado (5mL) e retirado o lavado contendo as células, posteriormente o lavado foi centrifugo a 1500 rpm por 10 minutos e as células ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina, segundo descrito em Almeida et al (2009).

O tecido adiposo foi obtido das gorduras retroperitoneais. O tecido adiposo foi incubado com meio RPMI 1640 contendo colagenase a 0,2% por 2 horas a 37°C sob agitação, para dissolução do tecido e obtenção dos macrófagos. A reação foi paralisada acrescentando SFB para concentração final de 10%. As células foram lavadas três vezes com PBS 1x e ressuspensas em meio de cultura RPMI com 2% de SFB. Para contagem das células na câmara de Newbawer. Para a contagem, as células foram diluídas (1:40) em solução de Turk (Cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS).

Após as contagens, as células obtidas do lavado peritoneal e do tecido adiposo foram plaqueadas (1×10^6 /poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo para adesão dos macrófagos para a contagem de corpúsculos lipídicos, e em placas de 6 poços (2×10^6) para análise por Western Blotting. As células foram incubadas por 2 horas e, posteriormente, os poços foram lavados por três vezes com PBS 1x para a retirada das células não aderidas. Em seguida as células foram incubadas com meio RPMI com 2% de SFB e cultivadas para posterior estimulação com *M.bovis* e *T.cruzi*.

5.6 ESTÍMULO COM *TRYPANOSOMA CRUZI* E *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG

Macrófagos peritoneais e do tecido adiposo foram estimulados com *T.cruzi* cepas DM28C com 0,5 mL/poço (MOI 3:1) em placas de 24 poços para análise de corpúsculos lipídicos e em placas de 6 poços para Western Blotting, ambas contendo macrófagos cultivados em meio de cultura RPMI com Penicilina/Streptomicina e soro fetal bovino a 2% (SFB).

Após 24h incubando na estufa a 37°C, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x estéril para retirada dos parasitos não internalizados e as células foram incubadas por mais 24 horas conforme descrito em D'Ávila (2011).

Para infecção por *M.bovis* BCG, foi utilizada a vacina liofilizada obtida da Fundação Athaulfo de Paiva/RJ e ressuspensa (50 x 10⁶/ml) em RPMI sem soro e sem antibiótico. Macrófagos peritoneais e do tecido adiposo em placas de 24 e 6 poços cultivados em meio de cultura RPMI com Penicilina/Streptomicina e SFB a 2%, foram infectados por BCG (MOI 1:1). Após 1 hora os poços foram lavados três vezes com PBS 1x estéril para retirada das bactérias não internalizadas e as células foram incubadas por mais 24h a 37°C, como descrito em Almeida et al (2009).

5.7 CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

As células nas placas de 24 poços, destinadas para a coloração de corpúsculos lipídicos, foram fixadas em formalina 3,7% por 10 minutos, lavadas em tampão cocodilato 0,1M (pH 7,4) e posteriormente coradas com tetróxido de ósmio a 1,5% reduzido por tiocarbohidrazida a 1% por 5 minutos. Em seguida as lamínulas, lavadas em água destilada, foram montadas e preparadas para contagem de corpúsculo lipídico de 50 células consecutivas, utilizando microscopia de luz com objetiva de 100x (D'ÁVILA, 2006). Os resultados expressos em média ± EPM.

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS, ADIPOCINAS E EICOSANÓIDES

O sobrenadante das culturas, livre de células, foi coletado e armazenado a -20°C para as posteriores dosagens. As dosagens de TNF- α , TGF- β , IL-10, adiponectina e leptina foram realizadas por ELISA, conforme especificações do fabricante (R&D Systems).

A dosagem de PGE₂ foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA) segundo especificações do fabricante (Cayman Chemicals CO).

5.9 WESTERN BLOTTING

Macrófagos peritoneais e do tecido adiposo foram lisados com 80uL de tampão de lise e 30uL de amostra e os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em

SDS-PAGE 10% e transferida para uma membrana de PVDF. Após a transferência a membrana foi processada segundo descrito em Almeida et al (2009) para quantificação de COX-2.

Após a preparação dos géis separadores (7mL) e “stacking” (3mL) (Tabela 1), o “Temed” foi aplicado com a mistura entre as placas de vidro e adicionado Isopropanol para a polimerização do gel, as amostras foram fervidas para desnaturação da proteína, aplicados 30uL e foi feita a transferência em 80V por aproximadamente uma hora e quarenta minutos. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 hora com solução bloqueadora de leite em pó Molico® (2,5g) e posteriormente lavada cinco vezes com TBS tween. O anticorpo primário específico para COX-2 foi incubado overnight na geladeira, em seguida a aplicação do anticorpo secundário e revelação na câmara escura.

	Separate (mL)	Stack (mL)
H2O	5,9	4,1
30% acrilamida	5,0	1,0
1,5M Tris	3,8	0,75
10% SDS	0,15	0,06
10% APS	0,15	0,06
Temed	0,006	0,006

Tabela 1: Protocolo de soluções para Western blotting para quantidade proporcional a dois géis. Adaptado de Almeida et al (2009)

Foi realizada a mesma técnica para detecção da β -actina, proteína mais abundante no citoesqueleto e presente nas células em altas concentrações, considerada controle no protocolo de Western Blotting.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizada através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software), através da análise de variância ANOVA dos fatores e teste *t* de Student para comparação de dois grupos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeitos da dieta hiperlipídica no ganho de peso dos animais

Segundo Kim et al (2011), camundongos Balb/c obesos alimentados com dieta hiperlipídica tendem a um aumento de vacúolos lipídicos nos adipócitos, que nesse contexto podem atuar no desenvolvimento do processo inflamatório durante o a progressão tumoral.

Para avaliar as condições da obesidade, camundongos Balb/c fêmeas foram divididos em dois grupos: magros, alimentados com dieta padrão Nuvilab e obesos, alimentados com dieta hiperlipídica (HFD, do inglês “*High fat diet*”), sendo essa ração preparada pelo próprio laboratório de imunologia da UFJF e as pesagens realizadas semanalmente (0 a 16 semanas). Inicialmente, os animais não apresentaram diferença entre pesos. Ao término do período da dieta, ambos os grupos, magros e obesos, apresentaram diferença significativa em relação ao peso inicial (Figura 11), indicando que a dieta padrão e hiperlipídica induziram o ganho de peso dos animais. Entretanto, animais alimentados com a dieta hiperlipídica HFD apresentaram maior ganho de peso quando comparados com os animais alimentados com a ração padrão Nuvilab (Figura 11).

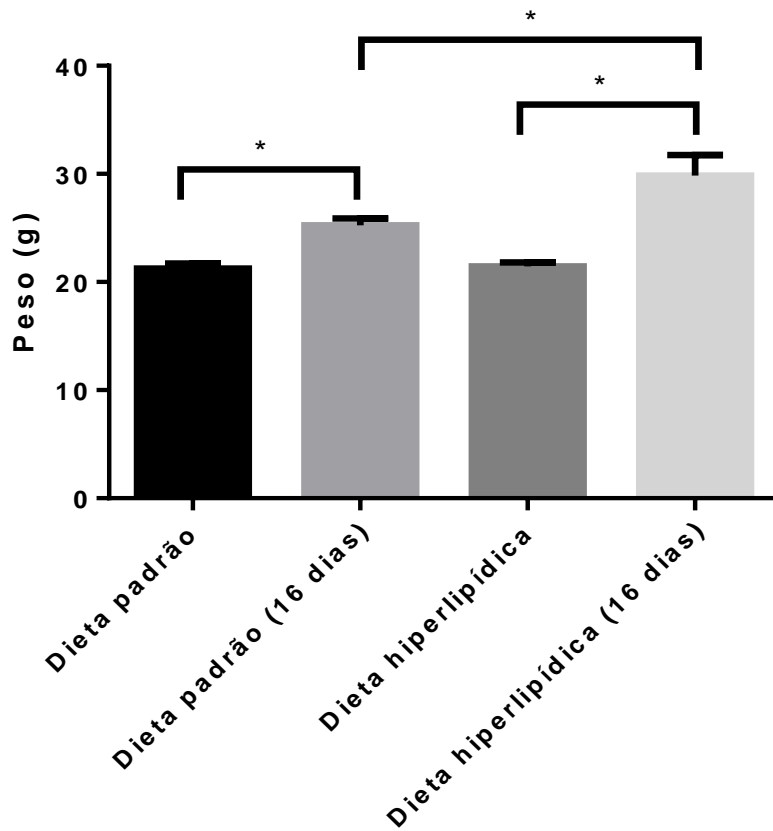


Figura 11: Efeitos da dieta padrão e hiperlipídica no ganho de peso de camundongos Balb/c fêmeas. Animais (n=24) foram alimentados com dieta padrão Nuvilab (n=12) e dieta hiperlipídica “HFD” (n=12) por 16 semanas. As células tumorais de linhagem 4T1 foram injetadas no final da dieta e os animais eutanasiados após 14 dias. O símbolo (*) indica diferença significativa $p < 0,05$. Gráficos projetados a partir do Programa Graphpad prism 6® utilizando o teste estatístico ANOVA. Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

6.2 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção por BCG e *T. cruzi*

Sabe-se que a ativação celular dependente de condições como inflamação, infecções por patógenos, como por *M. bovis* BCG e *T. cruzi*, e neoplasias podem levar a um aumento no número e nas dimensões dos corpúsculos lipídicos nas células do sítio inflamatório (WELLER et al, 1989; PACHECO et al, 2002; MELO et al, 2003; D'ÁVILA et al, 2006; MAYA-MONTEIRO et al, 2008; ACCIOLY et al, 2008).

Para investigar o efeito do desenvolvimento tumoral diante da obesidade na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecções, macrófagos peritoneais e isolados do tecido adiposo de animais magros e obesos com tumores foram re-estimulados *in vitro* com BCG ou *T. cruzi* por 24 horas. Macrófagos do tecido adiposo do grupo de animais magros e obesos, não infectados, apresentaram pequeno número de corpúsculos lipídicos (Figura 12 A, C) e não houve diferença entre eles. O mesmo foi observado nos macrófagos peritoneais (Figura 12 B, D). No entanto, quando ambos os tipos de macrófagos foram infectados por BCG (Figura 12 A, B) ou *T. cruzi* (Figura 12 C, D) foi possível observar aumento do número de corpúsculos lipídicos, tanto no grupo magro quanto no obeso. Macrófagos extraídos tanto do tecido adiposo quanto do peritônio de animais obesos, quando re-estimulados apresentaram aumento significativo quando comparados com os macrófagos extraídos dos animais magros e re-estimulados, entretanto houve maior formação de corpúsculos lipídicos diante do estímulo por BCG (Figura 12 A, B) quando comparados com o estímulo com *T. cruzi* (Figura 12 B, D). Estes dados sugerem que a obesidade por si só não aumenta o número dessas organelas durante o desenvolvimento tumoral, mas a infecção por patógenos induz formação dessas organelas, sendo este fenômeno potenciado na obesidade (Figura 12 A-D). Note em destaque, o grande número de corpúsculos lipídicos de grande diâmetro nos macrófagos de tecido adiposo de animais obesos infectados por *M. bovis* BCG.

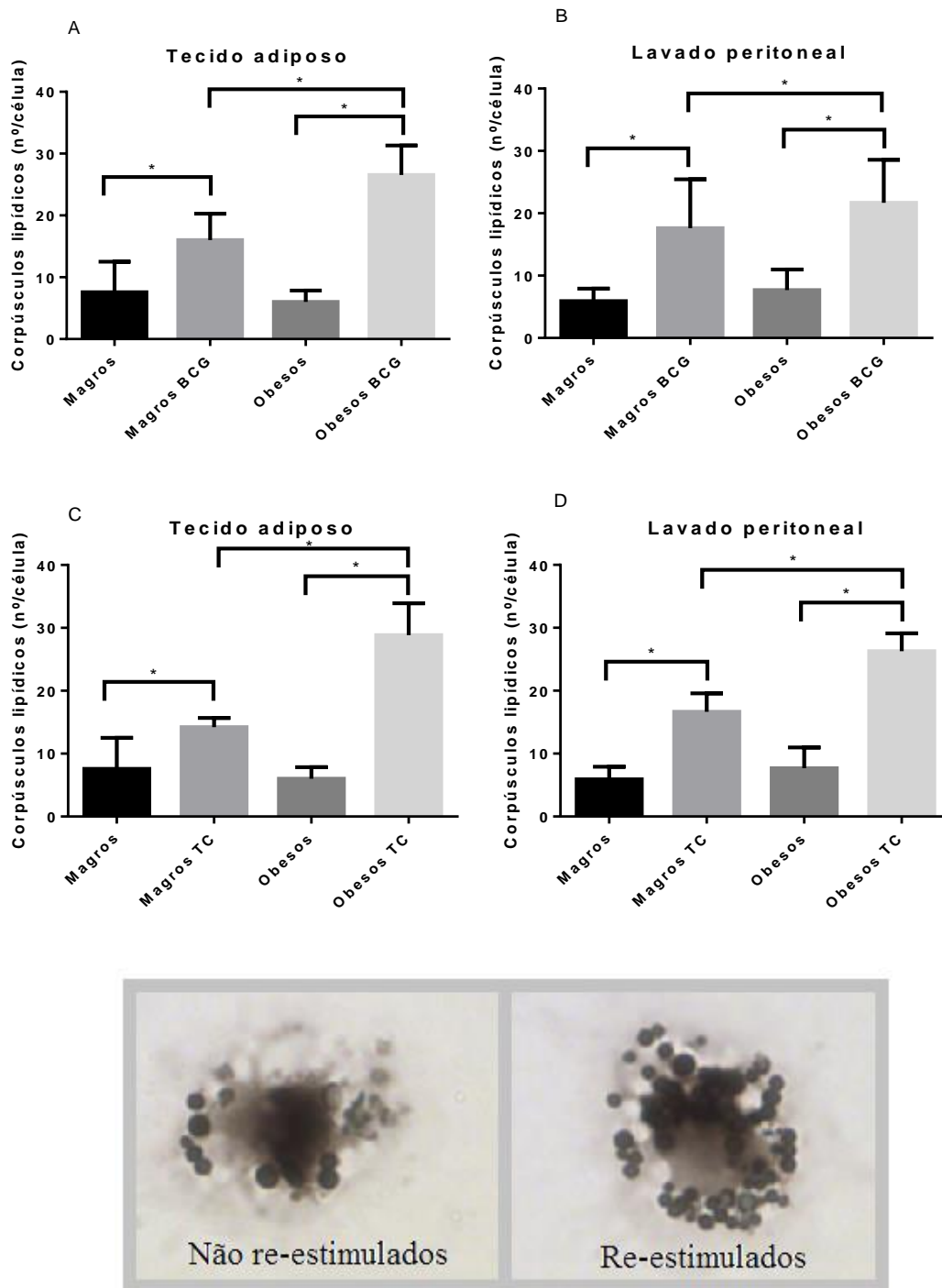


Figura 12: Formação de Corpúsculos lipídicos em macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio de animais obesos e magros com tumor de mama. Animais ($n \geq 4$) com 14 dias de estimulação por células tumorais de linhagem 4T1. As células extraídas do tecido adiposo (A, C) e do peritônio (B, D) foram re-estimuladas *in vitro* por *M. bovis* BCG (A, B) e *T. cruzi* (C, D) durante 24 horas para a contagem de corpúsculos lipídicos. O símbolo (*) indica diferença significativa, $p < 0,05$. Gráficos projetados a partir do Programa Graphpad prism 6® utilizando o teste estatístico ANOVA. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Em destaque, macrófagos do tecido adiposo extraído de animais obesos re-estimulados com BCG, exibindo corpúsculos lipídicos corados com tetróxido de ósmio e observados em microscopia de luz.

6.3 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de PGE₂ e expressão de COX-2 em macrófagos durante infecção por BCG e *T. cruzi*

A PGE₂ é um eicosanóide formado a partir do ácido araquidônico, resultante da ação catalizadora da enzima COX-2 quando a célula é estimulada nos processos inflamatórios. Bozza e cols (2007) mostraram que a produção de PGE₂ ocorre em paralelo ao aumento na formação de corpúsculo lipídico e D'Ávila e cols (2006; 2012) mostraram que os corpúsculos lipídicos são as principais regiões de produção de PGE₂ em leucócitos estimulados com patógenos, como *M. bovis* BCG e *T. cruzi*. Diversos estudos demonstraram que a PGE₂ é capaz de promover a proliferação, angiogênese associada ao tumor e inibição da apoptose, favorecendo e modulando o crescimento tumoral, contribuindo para o processo de metástase (CAMACHO et al, 2008; KUNDU, SURH, 2008).

Para investigar o desenvolvimento tumoral diante da obesidade, da síntese de PGE₂ e da expressão da COX-2 em macrófagos durante infecções, macrófagos peritoneais e isolados do tecido adiposo de animais magros e obesos com tumores, foram re-estimulados *in vitro* com BCG ou *T. cruzi* por 24 horas. A produção da PGE₂ foi avaliada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos e a expressão da COX-2 foi avaliada por Western blotting no lisado celular. Macrófagos extraídos do tecido adiposo (Figura 13 A, C) e do lavado peritoneal (Figura 13 B, D) do grupo de animais obesos não estimulados com BCG e *T. cruzi* demonstraram tendência a uma maior produção de PGE₂ e expressão de COX-2 (Figura 13 E) quando comparados aos grupos magros sem estímulo. Macrófagos extraídos do tecido adiposo dos animais magros e estimulados com *M. bovis* BCG, e *T. cruzi* obtiveram maior síntese de PGE₂ e maior expressão de COX-2 quando comparados aos seus respectivos controles sem estímulo (Figura 13 A, E). Essa produção foi potencializada nos macrófagos extraídos do tecido adiposo dos animais obesos após o estímulo (Figura 13 A). Por outro lado, macrófagos peritoneais dos grupos obesos e magros estimulados com BCG produziram menos PGE₂ quando comparados aos seus respectivos controles não infectados (Figura 13 B), podendo indicar que no peritônio a resposta seja mais lenta quando comparada à resposta no tecido adiposo. Entre macrófagos peritoneais e do tecido adiposo de animais obesos não houve diferença na expressão de COX-2 entre controles não infectados e estimulados com BCG e *T. cruzi*, no entanto os controles obesos já apresentavam grande expressão

de COX-2 (Figura 13 E, F). Além disso, houve alta produção de PGE₂ por macrófagos extraídos do peritônio (Figura 13 C, D), podendo-se destacar um aumento gradativo nos grupos infectados com *T. cruzi* (Figura 13 D), cuja síntese desse eicosanóide foi potenciada nos macrófagos extraídos de animais obesos, podendo indicar que no peritônio a resposta ao *Trypanosma* é branda, independente do quadro de obesidade.

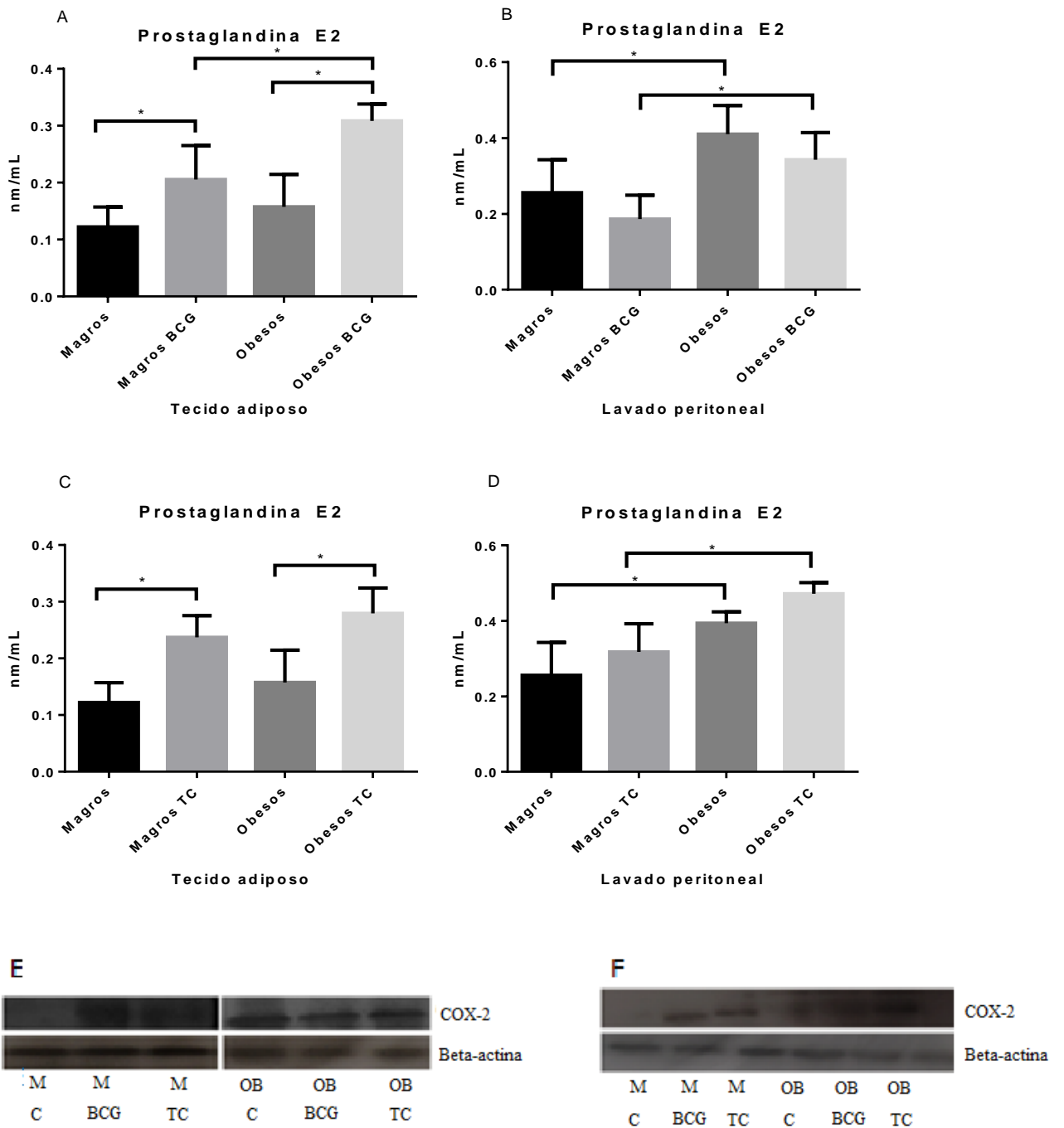


Figura 13: Análise da produção de mediadores inflamatórios nos macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio de animais obesos e magros com tumor de mama e a expressão de COX-2. Animais ($n \geq 4$) com 14 dias de estimulação por células tumorais de linhagem 4T1. As células extraídas do tecido adiposo (A e C) e do peritônio (B e D) foram re-estimuladas *in vitro* por *M. bovis* BCG (A e B) e *T. cruzi* (C e D) durante 24 horas para a dosagem de PGE₂ e expressão de COX-2. O símbolo (*) indica diferença significativa $p < 0,05$. Gráficos projetados a partir do Programa Graphpad prism 6® utilizando o teste estatístico ANOVA. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Western Blotting da expressão de COX-2 no tecido adiposo (E) e peritônio (F), e seus respectivos controles com β -actina.

6.4 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de adiponectina e leptina em macrófagos durante infecção por BCG e *T. cruzi*

Macrófagos isolados do tecido adiposo de animais magros e obesos com tumores foram re-estimulados *in vitro* com BCG ou *T. cruzi* por 24 horas. Após o cultivo das células, as dosagens de adipocinas foram realizadas no sobrenadante da cultura através de ELISA. Foi demonstrado que houve maior produção de adiponectina pelos macrófagos extraídos de animais magros com tumor (Figura 14 A, C), sendo esta produção diminuída quando o macrófago sofre estímulo com BCG (Figura 14 A) e aumentada quando sofrem estímulo com *T. cruzi* (Figura 14 C), além da diminuição da produção pelos macrófagos extraídos dos obesos. Por outro lado, pôde-se perceber que na presença de tumor em conjunto com um patógeno intracelular, a adiponectina, que é uma adipocina antiinflamatória, encontrou-se significativamente aumentada quando os macrófagos extraídos do tecido adiposo obeso são estimulados com BCG (Figura 14 A) e *T. cruzi* (Figura 14 C) em comparação ao obeso não infectado e com o magro infectado, sugerindo intensa resposta antiinflamatória. Em relação à leptina, não houve diferença entre magros infectados e não infectados (Figura 14 B, D). Entretanto, quando as células de animais obesos são estimuladas com BCG (Figura 14 B) e *T. cruzi* (Figura 14 D) ocorre um aumento significativo desta adipocina pelos macrófagos extraídos dos grupos estimulados quando em comparação com o grupo dos animais obesos não estimulados (Figura 14 B, D).

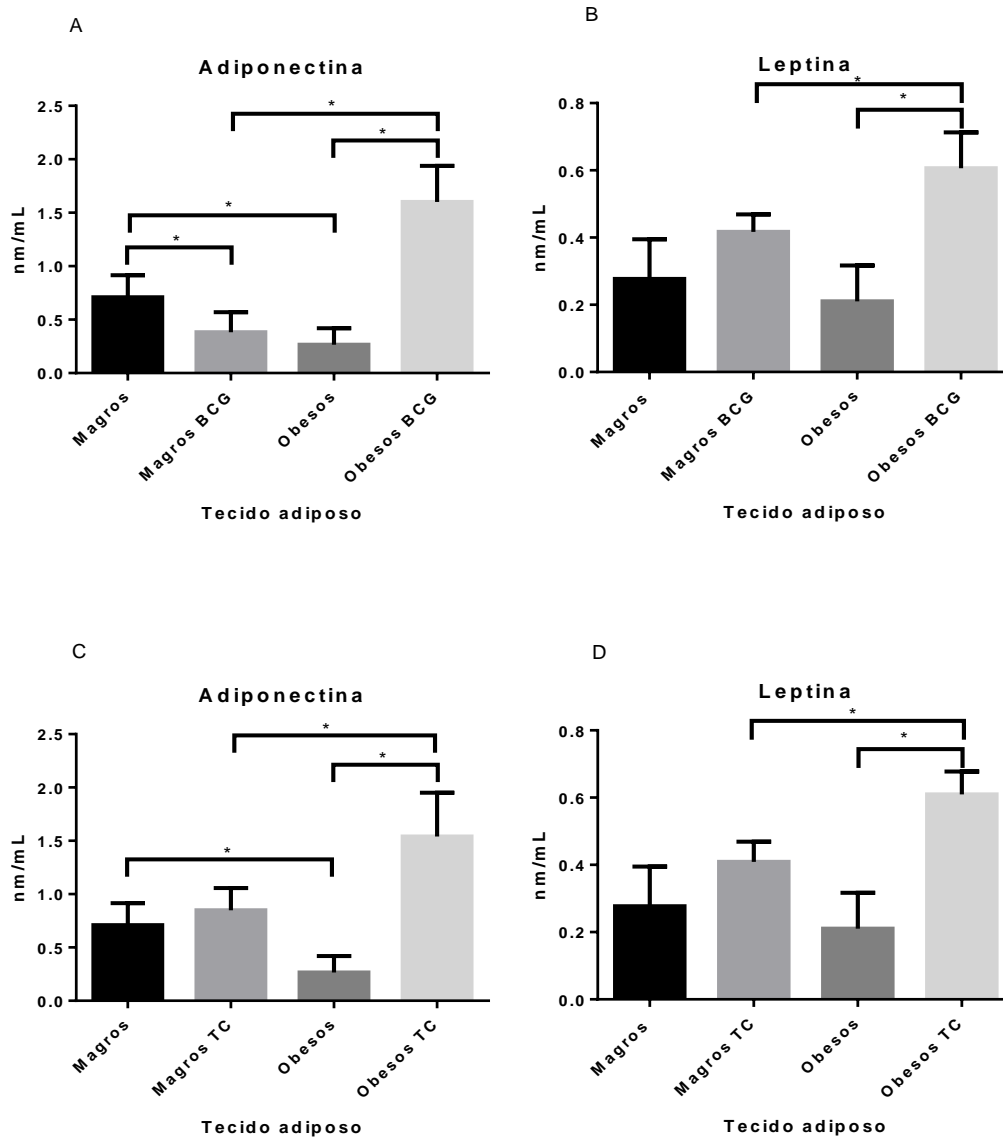


Figura 14: Análise da produção de adipocinas nos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos e magros com tumor de mama. Animais ($n \geq 4$) com 14 dias de estimulação por células tumorais de linhagem 4T1. As células extraídas do tecido adiposo foram re-estimuladas *in vitro* por *M. bovis* BCG (A e B) e *T. cruzi* (C e D) durante 24 horas para a dosagem das adipocinas inflamatórias - adiponectina e leptina. O símbolo (*) indica diferença significativa $p < 0,05$. Gráficos projetados a partir do Programa Graphpad prism 6® utilizando o teste estatístico ANOVA. Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

6.5 Efeito do desenvolvimento tumoral e da obesidade na produção de citocinas em macrófagos durante infecção por BCG e *T. cruzi*

Dentre as diversas citocinas que participam da resposta imune, nós analisamos a produção de: IL-10, TNF- α e TGF- β para comparação com trabalhos anteriores do nosso grupo (D'Ávila e col, 2006, D'Ávila e col, 2011 e Almeida e col, 2009).

Para investigar o efeito do desenvolvimento tumoral diante da obesidade, na modulação da resposta inflamatória, macrófagos isolados do tecido adiposo de animais magros e obesos com tumores foram re-estimulados *in vitro* com BCG ou *T. cruzi* por 24 horas para a análise das citocinas citadas através da técnica de ELISA. Foi demonstrado que os macrófagos extraídos de animais magros com tumor obtiveram maior expressão de IL-10 (Figura 15 A, D). Por outro lado, quando as células extraídas dos animais obesos são estimuladas com *M. bovis* BCG (Figura 15 A), assim como nos grupos estimulados com *T. cruzi* (Figura 15 D), houve menor produção desta citocina, enfatizando a modificação para um perfil pró-inflamatório (Figura 15 A, D), caracterizado pelo aumento significativo da citocina pró-inflamatória TNF- α pelos macrófagos extraídos dos animais obesos com tumor e estimulados com BCG (Figura 15 B) e *T. cruzi* (Figura 15 E). O aumento do TNF- α produzido pelos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos demonstra a intensidade da resposta inflamatória, cujos macrófagos extraídos de animais obesos com tumor apresentam aumento significativo na produção desta citocina quando comparados ao seu respectivo controle (Figura 15 B, E). E quando as células extraídas são estimuladas *in vitro* com BCG (Figura 15 B) e *T. cruzi* (Figura 15 E) a produção torna-se exacerbada, sendo diferente estatisticamente do seu respectivo controle e do grupo dos animais magros com BCG e *T. cruzi* (Figura 15 B, E). Além disso, foi demonstrado um aumento gradativo da produção da citocina reguladora TGF- β , que foi menor nos grupos magros do que nos obesos (Figura 15 C e F), e maior significativamente diante do estímulo com BCG (Figura 15 C) e *T. cruzi* (Figura 15 F) nos grupos estimulados quando comparados com seus respectivos controles e quando comparados os grupos obesos e magros. Esses resultados podem sugerir a presença de um estímulo para a angiogênese após a injúria causada pela resposta inflamatória.

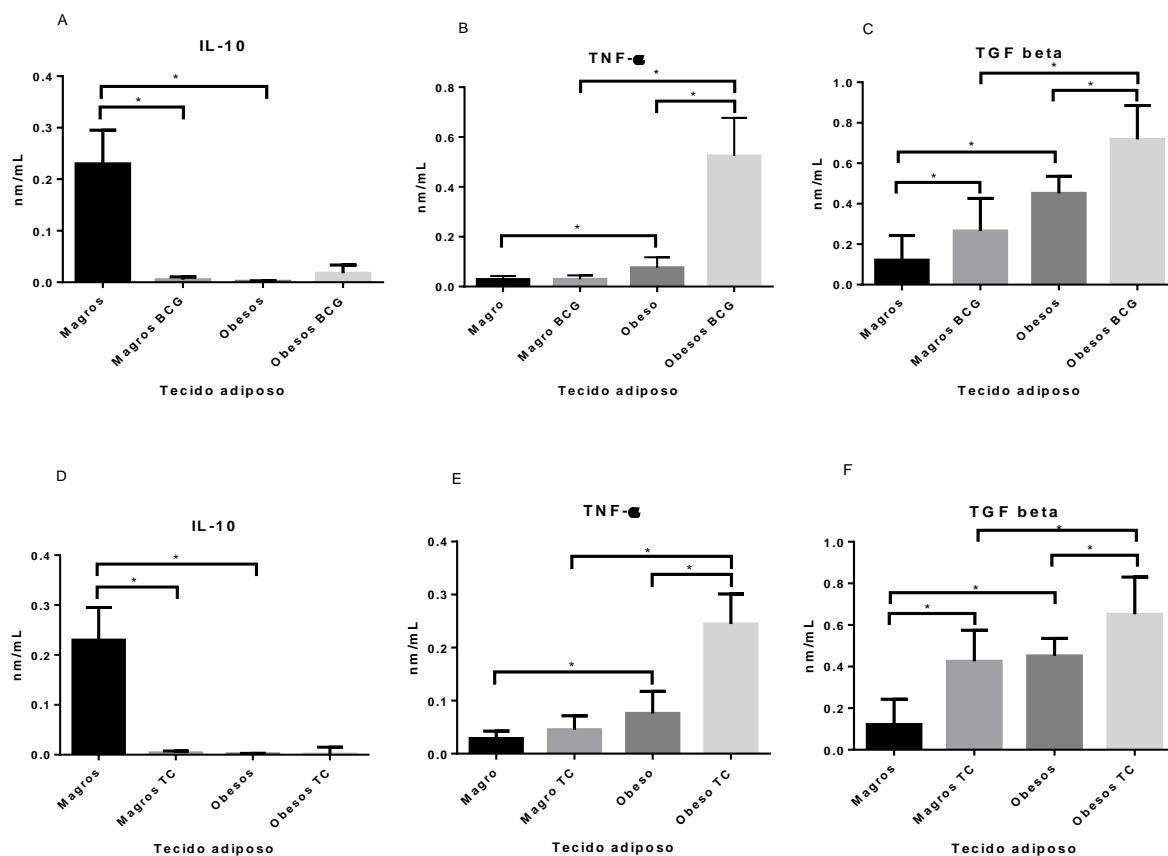


Figura 15: Análise da produção de citocinas nos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos e magros com tumor de mama. Animais ($n \geq 4$) com 14 dias de estimulação por células tumorais de linhagem 4T1. As células extraídas do tecido adiposo (A-F) foram re-estimuladas *in vitro* por *M. bovis* BCG (A-C) e *T. cruzi* (D-F) durante 24 horas para a dosagem de citocinas. O símbolo (*) indica diferença significativa $p < 0,05$. Gráficos projetados a partir do Programa Graphpad prism 6® utilizando o teste estatístico ANOVA. Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

7. DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a influência da obesidade e do desenvolvimento de tumores de mama na modulação da resposta contra infecção por patógenos intracelulares, como *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*, tendo como foco a inflamação e seus mediadores. A associação entre obesidade e o risco para o desenvolvimento do câncer é observada tanto em homens quanto em mulheres (HOTAMILISGIL, 1993; HOTAMILISGIL, 1995) e a inflamação é uma das condições verificadas na obesidade que pode contribuir, a princípio, com o desenvolvimento de um cancro.

O carcinoma mamário é uma das neoplasias malignas com maior incidência na mulher, caracterizado pelo crescimento desordenado das células epiteliais da mama. A mama é composta por adipócitos, as mesmas células que compõem o tecido adiposo, o qual compartilha funções semelhantes ao sistema imunológico, como a produção de citocinas pró-inflamatórias (CINTI et al, 2005).

As comorbidades associadas à obesidade são, em grande parte, atribuídas à inflamação crônica, uma característica metabólica da obesidade. Como consequência do aumento no tamanho dos adipócitos, há necrose dessas células e geração de sinais que induzem a infiltração de macrófagos nos tecidos através da produção da Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1 (MCP-1) (CINTI et al, 2005).

Sabe-se que além de adipócitos, o tecido adiposo é composto por células do sistema imune, como macrófagos e que nos quadros obesogênicos, com a hipertrofia do tecido adiposo, essas células sofrem alterações, dando início a um processo inflamatório (BERG, 2003; BAYS, 2008). Segundo revisão feita por Trayhurn & Wood (2004) a obesidade é caracterizada como estado de inflamação crônica de baixa intensidade. A inflamação responde de forma diretamente proporcional ao aumento da adiposidade corporal, e a maior infiltração de macrófagos, em proporção ao aumento do tamanho dos adipócitos, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, dentre elas a MCP-1, já que tanto os adipócitos hipertrofiados quanto os macrófagos são capazes de secretar tais citocinas (WEISBERG, 2003; BERG, 2005; YE, et al, 2007; HAJER, 2008). Sendo assim, a inflamação crônica age como fator de regulação da promoção e progressão tumoral através de vários mecanismos como a aceleração da proliferação celular, evasão da apoptose e aumento da angiogênese e da metástase (AGGARWAL et al, 2006). Ye et al (2007) realizaram estudo *in vitro* com

modelos animais e mostraram que na obesidade existe hipóxia e que esta pode contribuir com a inflamação crônica de baixa intensidade. Trayhurn & Wood (2004) sugerem que os adipócitos hipertrofiados comprimem a vasculatura do tecido, reduzindo a chegada de oxigênio, induzindo a hipóxia. Esta por sua vez estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias com finalidade de aumentar a angiogênese e o fluxo sanguíneo. Diante disso, hoje já se sabe que a hipóxia causada pela hipertrofia tecidual é o mecanismo inicial de estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias e que a inflamação progride com a expansão do tecido adiposo, capaz de gerar um microambiente propício ao desenvolvimento de tumores. Nosso estudo avaliou a resposta inflamatória de macrófagos extraídos do peritônio e comparou com a resposta de macrófagos extraídos do próprio tecido adiposo através da análise da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de adipocinas e eicosanóides que modulam a resposta inflamatória. Além disso, os macrófagos foram re-estimulados com *M. bovis* BCG e *T. cruzi* para investigar a relação entre obesidade, câncer e resposta do hospedeiro infectado.

Com relação ao câncer, sabe-se que o carcinoma mamário murino induzido por células 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e compreensão da biologia de tumores. Trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, onde são observadas metástases em diversos órgãos (CRISTINA, 2013). A imunossupressão diante de um tumor inicia-se com o desenvolvimento tumoral e atinge seu pico com o estabelecimento da metástase (WHITESIDE, 2009). No entanto, a imunossupressão induzida não é uma imunodeficiência clássica, mas sim, uma inibição agressiva às células do sistema imune responsáveis pela resposta antitumoral (WHITESIDE, 2009). Os modelos experimentais usando inoculação direta de células tumorais são avaliados através do estudo em camundongos imunodeprimidos Balb/c, permitindo um desenvolvimento mais eficaz e rápido dos cânceres e metástases, e por isso a escolha desse modelo no presente estudo e em outros de colaboradores, como Salvador (2014) e Gualberto (2015).

Vários modelos experimentais de obesidade foram desenvolvidos com o intuito de auxiliar na compreensão da fisiopatologia da obesidade (BOUSTANY et al, 2005; DU TOIT et al, 2005; CARROLL et al, 2006). Estudos sugerem que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam resposta exagerada em condições de estresse (BOUSTANY et al, 2005; DU TOIT et al, 2005; CARROLL et al, 2006) e que a utilização de dietas ricas em carboidratos e pobres em gorduras não são tão eficientes

quanto a dietas indutoras de obesidade com alto teor de gordura e pobres em carboidratos (HARROLD et al, 2000; ELLIS et al, 2002; GHIBAUDI et al, 2002).

Além disso, segundo Kim et al (2011), camundongos balb/c obesos alimentados com dieta hiperlipídica tendem a um aumento de vacúolos lipídicos nos adipócitos e, associado com as células tumorais, esses adipócitos podem atuar no desenvolvimento do processo inflamatório. Diante disso, nesse estudo foram utilizados camundongos Bab/c fêmeas tratadas com dieta padrão e dieta hiperlipídica, diferenciados entre magros e obesos, respectivamente, para se avaliar a influência da obesidade e progressão do tumor de mama na resposta inflamatória, avaliando macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio desses animais, e estimulados *in vitro* com os patógenos intracelulares *M. bovis* BCG e *T. cruzi*. Foi demonstrado que, ao término do período da dieta os grupos magros e obesos apresentaram diferença significativa de peso, indicando que a dieta padrão e hiperlipídica induziram um efeito de ganho de peso nos animais. E que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso quando comparados com os animais alimentados com a ração padrão.

Em se tratando de inflamação, o primeiro mediador que permitiu estabelecer uma relação entre obesidade e inflamação foi a citocina pró- inflamatória TNF- α (HOLST et al, 2008; LUMENG et al, 2007), altamente sintetizada e expressa no tecido adiposo tanto de animais como de humanos obesos (LUMENG et al, 2007; BAUD et al, 2009; RAHAMAN et al, 2006; BENSINGER et al, 2008), bem como por macrófagos infiltrados (HOTAMISGIL et al, 1993; KENNEDY et al, 2009; RAHAMAN et al, 2006).

A inflamação é um processo desencadeado por meio de mediadores originados nos tecidos lesados e nas células migratórias, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da enzima fosfolipase A2 e liberação de ácido araquidônico (AA), cuja atividade catalítica da COX-2 dá origem às prostaglandinas. A COX-2 é uma das isoformas da enzima ciclooxigenase, responsável pela síntese das prostaglandinas e encontram-se super-expressas nos estados inflamatórios, infecciosos, assim como nos tumores. Dentre os eicosanóides, a PGE₂, age diretamente nos tecidos promovendo crescimento celular, inibindo a apoptose, aumentando a produção de fatores angiogênicos, invasividade e crescimento metastático (WANG et al, 2009), sendo encontrada aumentada nos processos inflamatórios, na presença de tumores e nas infecções por patógenos intracelulares, entre eles o *T. cruzi* (MELO et al, 2003; FREIRE et al, 2000; D'ÁVILA, 2011) e *M. bovis* BCG (D'ÁVILA et al, 2006;

RANGEL et al, 2002; SHIBATA et al, 2005), com participação importante no mecanismo de patogênese destes agentes. Além disso, têm-se como estruturas de localização de enzimas formadoras de eicosanóides, a formação de gotículas de gorduras no citoplasma da célula, conhecido como Corpúsculos Lipídicos (CLs) (BOZZA et al, 2007; D'ÁVILA, 2006; D'ÁVILA, 2008).

Os corpúsculos lipídicos estão envolvidos no estoque e processamento de lipídios e presentes em todos os organismos. No entanto, apenas recentemente foram reconhecidos como organelas (FARESE; WALTHER, 2009), uma vez que participam de diversos processos celulares como sinalização, tráfico de membranas e síntese de mediadores inflamatórios (BOZZA et al, 2011). São organelas que apresentam uma grande quantidade de ácido araquidônico, o principal substrato utilizado na síntese de eicosanóides, além de proteínas relacionadas com o processo de sinalização celular (WAN et al, 2007). Tem sido demonstrado que os corpúsculos lipídicos podem ser os principais sítios intracelulares de produção de eicosanóides, uma vez que possuem um ambiente hidrofóbico ideal para o funcionamento da maquinaria responsável pela síntese de mediadores lipídicos. Foi demonstrado que a formação dos corpúsculos, constituição lipídica e o seu engajamento na produção de mediadores lipídicos estão relacionados com o estímulo inflamatório, mostrando que a formação dessas organelas em leucócitos teria um importante papel durante a resposta inflamatória em diversos processos patogênicos (D'AVILA; MAYAMONTEIRO; BOZZA, 2008).

É amplo o número de citações bibliográficas que relacionam corpúsculos lipídicos com processos inflamatórios e infecciosos. Durante processos de estimulação de natureza inflamatória, estes corpúsculos aumentam em número e tamanho em diversos subtipos celulares, incluindo macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos e se tornam sítios de importância significativa na condução do processo inflamatório (BOZZA et al, 2007; D'AVILA et al, 2008). Há cada vez mais evidências de que corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e funcionalmente ativas (WAN et al, 2007), compostas por lipídeos e proteínas, que variam conforme o estímulo ou tipo celular (MURPHY, 2001; MARTIN E PARTON, 2006; BOZZA et al, 2007). São organelas envolvidas em diversas funções como metabolismo lipídico (LONDOS et al, 2005), tráfico de membranas (LIU et al, 2003) e resposta imune (BOZZA et al, 2007).

Diversos patógenos intracelulares estão envolvidos com diversos tipos de ativação celular, assim como na geração de mediadores inflamatórios que participam da construção da resposta imune inata e adaptativa para esta infecção, dentre esses eventos,

destacamos e formação de corpúsculos lipídicos (DVORAK et al, 1983; WELLER et al, 1994, 1999; BOZZA et al, 2005). Nesse contexto tem sido mostrado que estas organelas participam da produção de mediadores durante a infecção. Pacheco e cols (2002) mostraram que LPS é capaz de induzir a formação de corpúsculo lipídico de maneira dependente de dose e tempo, e identificou nestas organelas, enzimas das vias de produção de leucotrienos e prostaglandinas, associando-a com a produção destes mediadores *in vitro* em modelo murino (PACHECO et al, 2002). Microorganismos inteiros ou componentes isolados da membrana destes microorganismos, tais como de *M. bovis*, aumentaram a quantidade de corpúsculos lipídicos em macrófagos, o que esteve associado com um aumento na produção de PGE₂ (D'AVILA et al, 2008). Melo e cols (2003) mostraram que durante a infecção em animais por *T. cruzi* houve uma intensa formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais, o que esteve correlacionado com a produção de PGE₂ no sítio inflamatório (MELO et al., 2003; MELO; SABBAN; WELLER, 2006).

Dados do grupo têm demonstrado que, ao infectar camundongos C57/B16 magros e obesos com *M. bovis* e *T. cruzi* há a indução do influxo de leucócitos para a cavidade intrapleural. Estes mesmos estudos demonstraram uma redução no influxo total de leucócitos e menor formação de corpúsculos lipídicos nos animais obesos, sugerindo que estes animais possam apresentar menor resposta inflamatória ou evolução lenta da resposta contra essas infecções em decorrência da obesidade (RODRIGUES et al, em preparação). Nossos resultados experimentais mostraram que ao utilizar camundongos Balb/c e estimular com células tumorais, a obesidade pode contribuir com o aumento da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio, mostrando que o próprio tumor seja capaz de induzir inflamação e formação de corpúsculos lipídicos, sendo potenciados durante a obesidade em conjunto com infecções *in vitro* por *M. bovis* BCG e *T. cruzi*.

A correlação entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da produção de eicosanóides foi descrita anteriormente em infecções bacterianas e por parasitas *in vivo* (D'AVILA et al, 2006; D'ÁVILA et al, 2011; D'ÁVILA et al, 2012). Nestes mesmos estudos foi demonstrado que os corpúsculos lipídicos são os principais sítios intracelulares de formação de PGE₂ (D'AVILA et al, 2006), reforçando o papel dessas organelas como regiões de síntese de mediadores lipídicos capazes de modular a resposta contra patógenos intracelulares. A COX-2 é a enzima que metaboliza o ácido araquidônico para formar as prostaglandinas. É induzida e expressa por células

envolvidas na inflamação e outras condições patológicas, como as neoplasias. De acordo com Eberhart et al (1994), a COX-2 está associada ao crescimento celular e ação de oncogenes. Esses autores demonstraram a presença dessa enzima em tecidos neoplásicos e sua ausência em tecidos normais. Além disso, a super expressão de COX-2 nas neoplasias tem sido associada a mecanismos de promoção tumoral, devido a indução da angiogênese, inibição da apoptose, aumento da capacidade de invasão e metástase, modulação da inflamação e da resposta imune (TSUJII et al, 1998; CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004). A expressão aumentada da COX-2 leva a alta concentração de prostaglandinas, especialmente a E2, que está relacionada com resistência à apoptose, promoção da angiogênese, capacidade de invasão e indução de imunossupressão (DEMPKE et al, 2001). A COX-2 modula a angiogênese e determina a habilidade em estimular o crescimento de células endoteliais, induzindo a formação de novos vasos sanguíneos, que é fundamental para a ocorrência de metástases (WANG & DUBOIS, 2004).

Os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos são regiões intracelulares de acúmulo de lipídeos neutro e fosfolipídeos, além da presença do ácido araquidônico (JOHNSON, 1999; WELLER, 1991; YU; 1998). Além destes componentes lipídicos, já foi demonstrada a presença de enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido araquidônico, entre elas a fosfolipase A2.

A importância dos corpúsculos lipídicos na síntese de mediadores inflamatórios já foi demonstrada em diversos processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos de ocorrência natural ou experimentalmente induzidos (BOZZA, 1998; TRIGGIANI, 1995; BEIL, 1995; WEINSTEIN, 1980). D'Ávila e cols (2011) demonstraram que a síntese de PGE₂ pelo ácido araquidônico pode ocorrer no interior do corpúsculo lipídico e que a inibição da formação do corpúsculo lipídico modula a síntese de PGE₂, além de modular a replicação do patógeno. Alterações no metabolismo lipídico da célula hospedeira são frequentemente observados e o aumento de corpúsculos lipídicos em leucócitos e outras células emergem como um fenótipo comum em doenças bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias.

Segundo Anes et al (2003), a conversão enzimática do ácido araquidônico em PGE₂ no interior dos corpúsculos lipídicos parece favorecer a sobrevivência do patógeno no interior do fagócito. Sendo assim, o aumento da capacidade dos macrófagos em produzir PGE₂ derivada dos corpúsculos lipídicos pode estar

relacionado com a inibição da resposta do hospedeiro, modulando negativamente a função imunológica do macrófago e positivamente o patógeno.

Ao avaliar a produção de PGE₂ por macrófagos extraídos do tecido adiposo e peritônio de camundongos Balb/c, e estimulados *in vitro* com *M. bovis* BCG e *T. cruzi*, demonstramos que houve uma tendência à maior produção deste mediador lipídico nos grupos de animais infectados, que é potencializado nos animais obesos. Além disso, as células extraídas do peritônio produziram menor PGE₂ quando comparados aos seus controles, indicando que as células peritoneais podem desenvolver uma resposta mais lenta ao tumor e ao patógeno. Os dados de produção de PGE₂ no tecido adiposo correlacionam-se com os dados da formação de corpúsculos lipídicos, demonstrando que a PGE₂ pode estar sendo formada a partir do ácido araquidônico contido no interior do corpúsculo lipídico, como descrito na literatura.

Em contrapartida, um estudo realizado pelo nosso grupo, utilizando camundongos C57Bl6 estimulados com BCG, porém sem tumor, observou-se menor produção de PGE₂ nos animais obesos quando comparados com os magros, dados estes co-relacionados com a diminuição da formação de corpúsculos lipídicos nos mesmos grupos de animais, mostrando mais uma vez a ação do tumor modificando a resposta inflamatória nos macrófagos dos animais obesos quando infectados.

Ao avaliarmos a expressão da COX-2, vimos que os macrófagos extraídos do tecido adiposo e do lavado peritoneal dos grupos de animais obesos não estimulados demonstraram uma maior expressão de COX-2, quando comparados aos grupos magros sem estímulo; e macrófagos do tecido adiposo estimulados obtiveram maior expressão de COX-2 quando comparados aos seus respectivos controles sem estímulo. Isso pode indicar que a obesidade esteja contribuindo para a maior expressão de COX-2 nos macrófagos extraídos do tecido adiposo e do peritônio dos animais obesos durante o desenvolvimento tumoral contribuindo com uma possível metástase. Além disso, a metástase e o desenvolvimento tumoral parecem primar as células para a produção dessa enzima durante a infecção por BCG e *T. cruzi*.

Experimentos realizados *in vitro* na fase aguda da doença de chagas demonstraram que PGE₂ induz imunossupressão ao interferir no processo de apresentação de antígeno, no qual, inibindo a expressão de moléculas MHC classe II, inibem também a ativação de linfócitos T, além de reduzir a secreção de IFN- γ . As prostaglandinas também são capazes de induzir mudança de classe de imunoglobulinas em linfócitos B, levando preferencialmente à produção de IgE e IgG1, inibindo a

resposta Th1, juntamente com a IL-10 (SILVA et al, 1995; GOLDEN & TARLETON, 1991; HARRIS et al, 2002), o que pode ser favorável ao patógeno.

Um estudo realizado por D'Ávila e cols (2006) demonstrou que na infecção intrapleural com *M. bovis* BCG há um aumento da expressão de COX-2, ao mesmo tempo que há um aumento significativo de síntese de PGE₂, como resultado da ação dessa enzima sobre o ácido araquidônico no interior dos corpúsculos lipídicos, levando em consideração que este mediador lipídico seja capaz de reduzir a capacidade de apresentação antigênica e diminuir a capacidade de produção de radicais oxidativos de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos. Além disso, este mesmo estudo conclui que a ação de alguns fármacos antiinflamatórios pode inibir a produção de corpúsculos lipídicos, auxiliando no combate ao patógeno.

Alterações do metabolismo lipídico da célula hospedeira são frequentemente observados e o aumento do número de corpúsculos lipídicos em leucócitos podem emergir como fenótipo comum entre infecções intracelulares (BOZZA et al, 2009; D'ÁVILA et al, 2008). D'Ávila (2011) investigou o mecanismo de formação de corpúsculo lipídico e síntese de PGE₂ na infecção por *T. cruzi* e demonstrou que este patógeno é capaz de modular o metabolismo lipídico. Demonstrou também a íntima relação da formação de corpúsculos lipídicos em células apoptóticas induzidas durante a infecção, além de demonstrar a expressão da COX-2 nas mesmas células. Além disso, esses dados reforçam os resultados anteriores que indicam que os metabólitos da COX-2 são cruciais para inibir a atividade de macrófagos e aumentar o crescimento dos parasitas. Sugerindo, em conjunto, que o aumento de corpúsculos lipídicos, PGE₂ e COX-2 em macrófagos de animais obesos juntamente com o desenvolvimento tumoral podem colaborar para a replicação dos patógenos.

A leptina e a adiponectina são adipocinas que permitem que o tecido adiposo seja considerado um órgão endócrino, visto que a leptina atua como hormônio responsável pelo controle do balanço energético (PAE et al, 2008; KASINSKI et al, 2008) e a adiponectina promove diminuição da adesão dos monócitos às células endoteliais e da formação de macrófagos ativos (BAUD et al, 2009). Sabe-se que os níveis de leptina encontram-se elevados em obesos (SINGH et al, 1995; KASINSKI et al, 2008) e sua concentração diminui com a perda de peso (SINGH et al, 1995). Ao contrário, os níveis de adiponectina aumentam com a redução significativa de peso (TOMAS-BARBEREN et al, 2000; GONTHIER et al, 2003).

No entanto, estudos anteriores do grupo demonstraram que durante a infecção por BCG em camundongos C57Bl6 magros e obesos, a produção da leptina tende a ser menor nos animais obesos e maior nos animais magros, além de a produção de adiponectina ser maior nos animais obesos, enfatizando o favorecimento do patógeno. Quando estimulamos camundongos balb/c com células tumorais, extraímos células do tecido adiposo e peritônio e re-estimulamos *in vitro* com BCG e *T. cruzi*, demonstramos que os macrófagos extraídos dos animais magros obtêm maior produção de adiponectina quando comparamos com o grupo dos obesos, dentro do esperado, já que a adiponectina trata de uma adipocina de perfil antiinflamaório. No entanto, na presença do tumor em conjunto com os patógenos, a adiponectina aumenta significativamente nos macrófagos do tecido adiposo obeso, mostrando a resposta antiinflamatória no animal estimulado com tumor. Embora não seja diferente estatisticamente, cabe ressaltar que a leptina tende a estar elevada nos animais magros não estimulados quando em comparação aos obesos não estimulados. A partir daí pode-se sugerir que a obesidade nos animais com tumor pode primar as células para a produção da leptina induzida por infecções intracelulares. Além disso, a leptina liberada por esses macrófagos pode também potenciar o mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos por estes patógenos, uma vez que Maya-Monteiro e col (2009) mostra que a leptina por si só é capaz de induzir a formação de corpúsculo lipídicos. Cabe ressaltar que assim como o esperado, a leptina no tecido adiposo de animais obesos estimulados tende à aumentar, assim como a produção de corpúsculos lipídicos, indicando que fêmeas balb/c obesas com tumor desenvolvem uma resposta mais branda ao serem re-estimulados com patógenos.

Infecções e injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção, podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções (JANEWAY, 2001).

Citocinas são glicoproteínas bioativas envolvidas na comunicação intercelular e atuam modulando aspectos da inflamação vascular, alterando a proliferação, diferenciação e função de uma variedade de tipos celulares. Estes produtos das células imunes são especialmente importantes na regulação de respostas imunes e inflamatórias, atuando em diversas etapas da imunidade inata e adaptativa (GIRN et al., 2007;

GALKINA; LEY, 2009). São secretadas por diversos tipos celulares, sendo os macrófagos a principal fonte (LIBBY et al., 1995; TEDGUI; MALLAT, 2006; BIASILLO et al., 2010). Sabe-se hoje que o tecido adiposo possui, além da capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central e trato gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições autócrinas, parácrinas ou endócrinas (HEBER, 2010). Atualmente, mais de cinquenta produtos derivados dos adipócitos já foram isolados e caracterizados (TILG et al, 2006). Nesse sentido, estudos experimentais mostraram que ratos obesos aumentam não apenas os níveis de TNF- α , mas também de outras citocinas pró-inflamatórias (GREGOR et al, 2011). Em contrapartida, em condições normais, ratos obesos diminuem os níveis de adipocinas antiinflamatórias, como a adiponectina e citocinas como a IL-10 (ARSLAN et al, 2010).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória (ZHANG, 2002; XU et al, 2002; YANG, 2006; KRAYCHETE, 2006; ARSLAN et al, 2010), secretada por monócitos/macrófagos e expressa nos adipócitos (KERN, 1995), diretamente relacionada com o processo inflamatório durante a obesidade após a infiltração de macrófagos (HARA et al, 2002). Dentre as diversas funções desta citocina está o aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias (KRAYCHETE, 2006; KENNEDY et al, 2009; BULLO et al, 2009), diminuição das citocinas antiinflamatórias (AGGARWAL et al, 2006) e promoção da apoptose celular (GÓNGORA, 2002; MURIEL, et al, 2009). Descrito em 1975 como fator solúvel no soro capaz de provocar necrose em células tumorais (CARSWELL et al, 1975), o TNF- α foi associado ao desenvolvimento de vários cânceres através da promoção da angiogênese (LEIBOVICH, 1987) e metástase (OROSZ et al, 1993), sendo que as concentrações elevadas dessa citocina tanto em roedores obesos induzidos quimicamente (JAIN et al, 2010) quanto em humanos obesos (KERN et al, 2001) sugerem uma ligação plausível entre obesidade e tumorigênese. Em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a interrupção da sinalização do TNF- α , através da deleção do gene que codifica o receptor do TNF- α (Tnfr1), bloqueia os efeitos carcinogênicos (PARK et al, 2010).

Pensava-se que a razão para o aumento observado dos níveis séricos desta citocina em indivíduos obesos fosse a superprodução realizada pelo excesso de tecido adiposo. Entretanto, atualmente tem sido reconhecido que esse aumento é devido à

infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo (GALIC, 2010; ARSLAN et al, 2010; GREGOR et al, 2011).

Os leucócitos ativados pelo TNF- α produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, essenciais para a eliminação de microrganismos (LIEW et al 1990; MEGYERI et al, 1995; TRACEY et al. 2008). Desta forma, a ativação de células do sistema imune pelo TNF- α é essencial para o controle de infecções, como *M. bovis* BCG e *T. cruzi*. Nossos experimentos demonstraram aumento significativo de TNF- α nos macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais obesos estimulados com tumor e re-estimulados com ambos os patógenos, quando comparados aos demais grupos, mostrando a existência de um processo inflamatório intenso. Também já foi demonstrado que o aumento no processo inflamatório está associado com aumentos concomitantes nos níveis de leptina (BRADLEY et al, 2008), sendo esta capaz de influenciar na produção de TNF- α , reforçando a relação do processo inflamatório crônico de baixa intensidade com a obesidade.

Nós demonstramos uma marcante produção, pelo menos basal, da leptina em todos os grupos, embora não haja diferença significativa nos animais magros, mostrando que o tumor por si só é capaz de induzir a produção dessa adipocina. Quando as células extraídas de animais obesos foram estimuladas com os patógenos, houve aumento significativo de leptina nos grupos estimulados, assim como do TNF- α , mostrando uma possível relação dessa citocina com a leptina nas células do tecido adiposo, assim como já foi demonstrado por outro estudo do nosso grupo (RODRIGUES et al, em preparação). Nosso modelo experimental também foi capaz de confirmar o papel do macrófago de tecido adiposo como grandes produtores de TNF- α e leptina em animais obesos com tumor infectados com patógenos intracelulares.

Além disso, já foi demonstrado também pelo nosso grupo que em animais obesos infectados *in vivo* com BCG, a resposta se desenvolve de forma mais lenta ao *M. bovis*, devido a maior expressão de uma citocina antiinflamatória, a IL-10. Em contrapartida, nossos experimentos mostraram que a resposta contra infecção *in vitro* com BCG e *T. cruzi* pelas células presentes no tecido adiposo juntamente com a presença de um tumor, é intensa e rápida, sendo que após 14 dias a expressão de TNF- α aumenta em níveis inversamente proporcionais à IL-10, sugerindo que a intensidade da resposta se deve à menor expressão da citocina antiinflamatória.

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida principalmente por macrófagos e linfócitos (ARSLAN et al, 2010) e encontra-se em maiores concentrações

em indivíduos magros, decaindo a medida que o tecido adiposo se expande (GALIC, 2010). Além disso, estudos apontam que no tecido adiposo a IL-10 é produzida por macrófagos M2, principalmente em indivíduos magros (GALIC, 2010) e sua principal função é de regulação do sistema imune, inibindo significativamente a expressão e/ou síntese de citocinas ou adipocinas pró-inflamatórias (VOLP et al, 2008).

Já foi demonstrado que na presença de infecções intracelulares por BCG, a IL-10 encontra-se extremamente elevada nos animais obesos, realçando que nessas situações a resposta se desenvolve de forma lenta e menos agressiva. De forma contrária, nós demonstramos uma resposta antiinflamatória dessa citocina, que inicialmente esteve intensa, produzida por macrófagos extraídos do tecido adiposo de animais magros com tumor. Isso pode indicar que, embora haja presença do tumor, inicialmente a resposta não é tão agressiva nesses animais. Entretanto, ao estimular essas células com *M. bovis* e *T. cruzi*, há uma mudança no perfil da resposta dos macrófagos de tecido adiposo dos animais obesos, caracterizado pela diminuição drástica de IL-10, inclusive nos animais magros, podendo nos mostrar que a presença dos microorganismos intracelulares em estudo foi capaz de potencializar o processo inflamatório na obesidade. Sabendo que a IL-10 pode ser relacionada com a adiponectina, nossos dados reforçam essa hipótese, mostrando a alteração do perfil de excreção de citocinas e adipocinas na presença de tumores, direcionando uma resposta mais agressiva.

A presença de citocinas reguladoras de crescimento torna-se importante diante da injúria tecidual causada pelos processos inflamatórios. O TGF- β é uma citocina secretada por células T regulatórias, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e musculares lisas (GRAINGER, 2004; HANSSON et al, 2006). Esta citocina pertence a uma grande família de moléculas reguladoras do crescimento multifuncionais com importantes propriedades pró e antiinflamatórias, dependendo do ambiente e da concentração em que se encontram (GRAINGER, 2004; HANSSON et al, 2006). O TGF- β é responsável por regular a proliferação e a diferenciação de células (KEHRL et al., 1986; LING & ROBINSON, 2002), estimular a síntese da matriz extracelular, a angiogênese e a imunomodulação (LING & ROBINSON, 2002). Aqui nós demonstramos um aumento dessa citocina nos grupos de animais obesos com tumor estimulados com *M. bovis* quando comparados aos seus respectivos controles, e, embora diante da infecção por *T. cruzi* não haja diferença entre obesos com tumor infectados comparados com seu controle, há uma tendência desse aumento. Dentre as propriedades pró-inflamatórias importantes do TGF- β , pode-se destacar a capacidade de recrutar

monócitos, células T e neutrófilos para os locais de inflamação, no início da infecção, através da modulação da expressão de moléculas de adesão das células endoteliais (GRAINGER, 2004; HANSSON et al, 2006). Nossos experimentos demonstraram essa importância, indicando que na presença de tumores, juntamente com os patógenos em estudo, essa citocina pode participar do recrutamento de células para o local no início da infecção, juntamente com a modulação do processo inflamatório diante dos estímulos. Além disso, o TGF- β também pode participar indiretamente do aumento da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂ (D'ÁVILA et al, 2011) nos macrófagos de animais obesos infectados e esses dados vão ao encontro dos nossos dados que mostram maior formação de corpúsculos lipídicos nos animais obesos estimulados com BCG e *T.cruzi*, assim como maior produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, contribuindo para uma maior suscetibilidade dos animais durante a infecção.

De maneira geral, o estímulo com células tumorais em camundongos Balb/c fêmeas juntamente com a obesidade induziram um processo inflamatório, com características favoráveis à infecção por patógenos intracelulares, especialmente com relação à produção de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE₂, TGF- β e adipocinas. Nossos dados reforçam a hipótese de que patógenos intracelulares, como BCG e *T.cruzi*, são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos como estratégia de sobrevivência, modulando a resposta inflamatória a favor do próprio patógeno, mostrando mais uma vez, a participação dos corpúsculos lipídicos na modulação da resposta imune e da inflamação.

8. CONCLUSÃO

Nessa dissertação foram abordadas as participações de citocinas, eicosanóides e corpúsculos lipídicos na modulação da resposta inflamatória durante a infecção por *M. bovis* BCG e *T. cruzi* em macrófagos oriundos de animais magros tratados com dieta padrão e obesos tratados com dieta hiperlipídica na presença de células tumorais.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a obesidade e a progressão tumoral foram capazes de modular a resposta do hospedeiro durante infecção por patógenos intracelulares, como *M. bovis* BCG e *T. cruzi*. Em oposição ao que já foi observado previamente em animais obesos sem tumores (RODRIGUES et al, em preparação), a formação de corpúsculos lipídicos, a expressão de COX-2, a produção de TNF- α e TGF- β foram potencializadas nos macrófagos de animais obesos com tumores estimulados com os patógenos em estudo. Estes dados foram acompanhados por uma inibição na síntese de IL-10 e uma tendência de aumento de PGE₂ pelos macrófagos de tecido adiposo de animais obesos com tumores durante as infecções.

Com isso, animais obesos com tumores apresentaram mais fatores de favorecimento dos patógenos, como formação de corpúsculo lipídico, PGE₂ e TGF- β , indicando que estes animais oferecem um ambiente mais favorável para o crescimento destes patógenos intracelulares. Entretanto, novos estudos, como testes de viabilidade dos patógenos e caracterização de populações de macrófagos e estudos *in vivo*, se fazem necessários para avaliarmos mais efetivamente os efeitos dessas alterações derivadas da obesidade e de tumores na sintomatologia da tuberculose e Doença de Chagas.

Estes dados sugerem que na obesidade concomitante com o desenvolvimento tumoral, os macrófagos de animais obesos expressam características pró-inflamatórias e sugerem que o próprio tumor, em conjunto com a obesidade, estimule a formação dos corpúsculos lipídicos devido ao processo inflamatório, aumentando ainda mais em infecções intracelulares.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K, Lichtman, A.H, 2007. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders Elsevier

Abbas, A.K; Lichtman, AH; Pillai, S. Imunologia celular e molecular, 2011. Tradução 7ª Edição: 389-97

Aggarwal, B.B; Shishodia, S; Sandur, S.K; Pandey, M.K; Sethi, G, 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Rev Biochem Pharmacol (11)1605-21**

Aggarwal, B.B; Shishodia, S, 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol (10)1397-421**

Arslan, N; Erdur, B; Aydin, A, 2010. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian Pediatr (10)829-39**

Associação Brasileira para o Estudo de Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2009. Acesso em 15 de maio de 2014. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/pagina/256/nutrigenomica.shtml>

Bandeira, M.C; Phoofolo, M; Weller, P.F, 2001. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. **Journal of biological chemistry (25) 779-87**

Barreto, R.C; Pereira, G. A. S; Costa, L. J; Cavalcanti, H. R. B. B, 2011. O duplo papel da inflamação no surgimento de lesões cancerígenas. **Rev. Brasileira de Ciências da Saúde (14) 107-114**

Baud V; Karin, M, 2009. Is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nat Rev Drug Discov (1)33-40**

Bays, H.E; González-Campoy, J.M; Bray, G.A; Kitabchi, A.E; Bergman, D.A; Schorr, A.B; Rodbard, H.W; Henry, R.R, 2008. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. **Expert Rev. Cardiovas. Ther (3)343-368**

Bensinger, S.J; Tontonoz, P, 2008. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature (7203)470-7**

Berg, A.H; Scherer, P.E, 2005. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circ. Res. (96)939-949**

Bozza, P.T; Bandeira-Melo, C, 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. **Mem Inst Oswaldo Cruz – 100 (Suppl 1)113-20**

Bozza, P.T; Melo, R.C; Bandeira-Melo, C, 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & therapeutics (1)30-49**

Bozza, P.T; Nagalhães, K.G; Weller, P.F, 2009. Leukocyte lipid bodies biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1791:540-551**

Borges-Osório, M. R; Robinson, W. M, 2001. **Genética Humana. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 278-299**

Boustany, C. M, 2005. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **(289)181-6**

Bradley, R.L; Jeon, J.Y; Liu, F.F; Maratos-Flier, E, 2008. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **(3)586-94**

Brambilla, E, 2006. Expressão imunohistoquímica da proteína ciclooxigenase-2 nas neoplasias colorretais. **Dissertação de mestrado em Medicina- UFRS.**

Brasaemle, D.L, 2007. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res* **(48)2547-2559**

Breast Cancer, Care: Doença Paget Mamilo. Acesso em 31 de janeiro de 2015. Disponível em <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos/cdi>

Breast Cancer: Carcinoma ductal invasivo. Acesso em 31 de janeiro de 2015. Disponível em <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos/cdi>

Bullo, M; Casas-Agustench, P; Migo-Correig, P; Aranceta, J; Salas, S. J, 2007. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr.* **(10)1164-72**

Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer, L.C, 2007. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* **(15)798-808**

Camacho, M; Leon, X; Fernandes-Figueiras, M.T; Quer, M; Vila, L, 2008. Prostaglandin E2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *HeadNeck* **(30)1705-81**

Cao, y; Prescott, S.M, 2002. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cell Physiology* **(190) 279-286**

Cardona, P.J; Llatjos, R; Gordillo, S; Diaz, J; Ojanguren, I; Ariza, A and Ausina, V, 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* **(52)156-163**

Carswell, E.A; Old, I.J; Kassel, R.L; Green,S; Fiore, N; Williamson, B, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* **(72) 3366-3370**

Carvalho, L. R; 2013. Inflamação e câncer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda. **Dissertação de mestrado USP**

Carroll, J. F; Zenebe, W. J; Strange, T. B, 2006. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension (48)65-72**

Carvalho, M. H.C, 2006. Citocinas, difusão endotelial e resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab (50) 304-12**

Charron, A.J.; Sibley, L.D, 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science (115) 3049-59**

Chen, J.S; Greenberg, A.S; Wang, S.M, 2002. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. **J Cell Biochem (4)784-91**

Cinti, S; Mitchell, G; Barbatelli, G; Murano, I; Ceresi, E; Faloia, E, 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res (11)2347-55**

CONASS, Conselho Nacional de Secretários da Saúde. Acesso em 20 de novembro de 2014. Disponível em http://www.conass.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=3546:pesquisa-vigitel-apos-oito-anos-em-ascensao-obesidade-no-brasil-para-decrescer&catid=3:noticias&Itemid=12

Cohen, P; Zhao, C; Cai, X; Montez, J.M; Rohani, S.C; Feinstein, P, 2001. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. **J Clin Invest (8)1113-21**

Coussens, L. M; Werb, Z, 2002. Inflammation and Cancer. **Nature (420)19-26**

Davis, J.E; Gabler, N.K; Walker-Daniels, J; Spurlock, M.E, 2009. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. **Horm Metab Res (7)523-30**

D'Ávila, H. et al, 2006 *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J Immunol 5(3)3087-3097**

D'Ávila, H; Maya-Monteiro, C.M; Bozza, P.T, 2008. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International immunopharmacology* (inpress).

D'Ávila, H., Maya-Monteiro, C.M; Bozza, P.T.; 2008. Lipid Bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **Int Immunopharmacol (8)1308-15**

D'Ávila, H. et al, 2008. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. **Cellular microbiology 12 (10)2589-60**

D'Avila, H. et al, 2011. Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. **The Journal of infectious diseases** **6 (204)951-61**

D'Avila, H; Maya-Monteiro, C.M; Bozza, P. T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **International immunopharmacology** **10(8) 1308-15**

Dempke, W; Rie, C; Grothey, A; Schmoll, H.J, 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Cancer Research** **(127) 411- 417**

DeSatis, C; Ma, J; Bryan, L; Jemal, A, 2014. Breast Cancer Statistic. **A journal for clinicians** **(1) 52-62**

De Visser, K.E; Eichten, A; Coussens, L.M, 2006. Paradoxical Roles of the Immune System During Cancer Development. **Nature Reviews Cancer** **(1) 24-37**

Du Toit, E. F; Nabben, M; Lochner, A, 2005. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Res Cardiol** **(100)346-54**

Dudley, M.E; Wunderlich, J.R; Robins, P.F; Yang, J.C; Hwu, P; Schawartzentruber, D.J; Topalian, S.L; Sherry, R; Restifo, N.P; Hubicki, A.M; Robinson, M.R; Raffeld, M; Duray, P; Seipp, C.A; Rogers-Freezer, L; Morton, K.E; Mavroukakis, S.A; White, D.E; Rosenberg, A.S, 2002. Cancer regression and autoimmunity patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science** **(298)850-54**

Dunn, G.P; Bruce, A.T; Ikeda, H; Old, L.J; Schreiber, R.D, 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol** **(3)991- 8**

Dvorak, A.M; Dvorak, H.F; Peters, S.P; Shulman, E.S; MacGlashan, D.W; Jr., Pyne, K, 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. **J Immunol** **(6)2965-76**

Eberhat, C. E; Coffey, R. J; Radhika, A; Giardello, F. M; Ferrenbach, S. Dubois, R. N, 1994. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human collateral adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology, Philadelphia** **(107) 1183-88**

Ellis, J; Lake, A; Hoover-Plow, J, 2002. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. **Nutr Res** **(22)609–621**

Enzler, T; Gillessen, S; Manis, J.P, 2003. Deficiencies of GM-CSF and interferon-gamma link inflammation and cancer. **The Journal of Experimental Medicine** **(197) 1213-19**

Ferrantini, M; Capone, I; Belardelli, F, 2007. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews** **(19) 93-107**

Flegal, K.M; Carroll, M.D; Ogden, C.L; Curtin, L.R, 2010. Prevalence and trends in obesity among US adults. **Rev JAMA** **(3)235-41**

- Fonseca-Alaniz, M.H; Takada, J; Alonso-Vale, M.I.C; Lima, F.B, 2006. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Rev Arq Bras Endocrinol Metab (2)216-229**
- Frieden, T.R; Sterling, T.R; Munsiff, S.S; Watt, C.J and Dye, C, 2003. **Tuberculosis. Lancet (362)877-899**
- Galic, S; Oakhill, J.S; Steinberg, G.R, 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol. (2)129-39**
- Gatromed, Instituto Gilberstein. Obesidade e comorbidades. Acesso em 10 de dezembro de 2014. Disponível em http://www.gatromed.com.br/br/obesidade/obesidade_riscos_comorbidades.php
- Ghibaudi, L, 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. **Obes Res (10)956-63**
- Goldstein, B.J; Scalia, R, 2004. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab (6)2563-2568**
- Góngora, L; Giner, R.M; Máñez, S; Recio, M.C; Schinella, G, 2002. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. **Life Sci (25)2995-3004**
- Gonthier, M.P; Verny, M.A; Besson, C; Remesy, C; Scalbert, A, 2003. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **J Nutr (133)1853-9**
- Grainger, D. J, 2004. Transforming Growth Factor β and Atherosclerosis: So Far, So Good for the Protective Cytokine Hypothesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol (24) 399-404**
- Greenspan, P; Mayer, E.P; Fowler, S.D, 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **J. Cell Biol., 100:2742-2744**
- Gregor, M.F; Hotamisligil, G.S, 2011. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annu Rev Immunol (29)415-45**
- Grivennikov, S.I; Greten, F.R; Karin, M, 2010. Immunity, inflammation and cancer. **Cel (6) 883-889**
- Grudzinski, M.G; Cambruzzi, E; Lahude, E; Savaris, R.F; Pedrini, J.L; Zettler, C, G, 2006. Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre da doença. **Rev Assoc Med Bras (4)275-80**
- Guermontprez, P; Saveanu, L; Kleijmeer, M; 2003. Phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature (425)397-402**
- Guimarães e col, 2007. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev Nutr Campinas (5)549-559**

Hagita, S et al, 2011. Adipose inflammation initiates recruitment of leukocytes to mouse femoral artery: role of adipo-vascular axis in chronic inflammation. **Plos One 5 (6)19872**

Hajer, G.R; Van, H.T.W; Visseren, F.L.J, 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal (1-13)**

Hansson, G.K; Robertson, A.K.L; Söderberg-Nauclér, C, 2006. Inflammation and Atherosclerosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. (1)297-329**

Hara, K; Boutin, P; Mori, Y, 2002. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. **Diabetes (51)536-40**

Hartmann, L.C et al, 1997. Ductal carcinoma in situ of breast. **Annals of internal medicine, 1013-22**

Harrold, J. A; Williams, G; Widdowson, P. S, 2000. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. **J Neurochem (74) 1224-8**

Heath, W.R; Belz, G.T; Behrens, G.M, 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunological reviews (199) 9-2**

Heber, D, 2010. An integrative view of obesity. **Am J Clin Nutr (1)280S-3S**

Helman, S; Harris, J.R, 2000. Diseases of Breast Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Inflamação e resposta imune. Acessado em 08/05/2014. Disponível em:<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/6098/inflamacao-e-resposta-imune-em-obesidade>

Holst, B; Williamson, G, 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Curr Opin Biotechnol. (2)73-82**

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

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

Hu, E; Liang, P; Spiegelman, B.M, 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol Chem Ed (271)10697-10703**

Institute, National Cancer. Breast Cancer Treatment, 2013. Acesso em 31 de janeiro de 2015. Disponível em Pubmed Health <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Acessado em 08/05/2014. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Acessado em 03/02/2015. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>

Jackson, K.E et al, 2004. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular microbiology (54)109-22**

Jain, S.S; Bird, R.P, 2010. Elevated expression of tumor necrosis factor-alpha signaling molecules in colonic tumors of Zucker obese (fa/fa) rats. **Int J Cancer (9)2042-50**

Janeway, C.A Jr., 2001. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect (3)1167-71**

Jéquier E, 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann N Y Acad Sci. (967)379-88**

Kalupahana, N.S; Moustaid-Moussa, N; Claycombe, K.J, 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med (33)26-34**

Kaplan, D; Shankaran, V; Dighe, A.S, 1998. Demonstration of an interferon gamma - dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **The Proceedings of the National Academy of Sciences (95)7556-61**

Kasinski, A.L; Du, Y; Thomas, S.L; Zhao, J; Sun, S.Y; Khuri, F.R 2008. Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel analog of curcumin. **Mol Pharmacol (3)654-61**

Kennedy, A; Martinez, K; Chuang, C.C; LaPoint, K; McIntosh, M, 2009. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr (1)1-4**

Kern, P.A e cols, 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insuline resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab (280) 745-51**

Khandekar, M.J; Cohen, P; Spiegelman, B. M, 2011. Molecular mechanism of cancer development on obesity. **Nature Reviews Cancer Ed 11(12) 886-95**

Klimp, A.H; De Vries, E.G; Scherphof, G.L; Daemen, T, 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology (2)143-61**

- Kundu, J.K; Surh, Y.J, 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutat Res (1)15-30**
- Lawrence; Willoughby, D.A; Gilroy D.W, 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Rev Immunol (2)787-795**
- Leibovich, S.J; Polverini, P.J; Shepard, H.M; Wiseman, D.M; Shively, V; Nuseir, N, 1987. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. **Nature (6140)630-2**
- Li, C; Shintani, S; Terakado, N, 2002. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep (9)1219-1223**
- Liew, F.Y; Li, Y; Millott, S, 1990. Tumor necrosis factor -alpha synergizes with INF-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. **J Immunol (12) 4306-4310**
- Lin, E.Y; Nguyen, A.V; Russell, R.G; Pollard, J.W, 2001. Colony-stimulation factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp.Med (193)727-40**
- Lin, E.Y; Pollard, J.W, 2007. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. **Cancer Research (67)5064-66**
- Liu, P; Ying, Y; Zhao, Y; Mundy, D.I; Zhu, M; Anderson, R.G, 2004. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. **J Biol Chem (5)3787-92**
- Loeb, L.A; Harris, C.C, 2008. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Research (68)6863-72**
- Lopes, H.F, 2007. Hypertension and inflammation: contribution of obesity. **Rev Bras Hipertens Ed 14(4)239-244**
- Londos, C; Sztalryd, C; Tansey, J.T; Kimmel, A.R, 2005. Role of PAT proteins in lipid metabolism. **Biochimie (1)45-9**
- Lumeng, C.N; Bodzin, J.L; Saltiel, A.R, 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation (117)175-184**
- Lumeng, C.N; Deyoung, S.M; Saltiel, A.R, 2007. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. **Am J Physiol Endocrinol Metab (1)166-74**
- Ma, J; Liu, L; Che, G; Yu, N; Daí, F; You, Z, 2010. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-smal cell lung cancer is positively associated with survival time. **BMC cancer (10)112**
- Mafra, D; Farage, N.E, 2006. O papel do tecido adiposo na doença renal crônica. **Rev J Bras Nefrol (2)108-113**

Mancini, M.C; Mancini, M.C; Geloneze, B; Salles, J.E.N; Lima, J.G; Carra, M.K, 2010. Obesidade e doenças associadas. **Tratado de Obesidade. Itapevi: AC Farmacêutica 253-64**

Mantovani, A; Sica,A; Sozzani, S; Allavena, P; Vecchi, A; Locate, M, 2001. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology (25) 677-686**

Mantovani, A; Germano, G; Marchesi, F; Locatelli, M; Biswas, S, 2011. Cancer promoting tumor-associated macrophages: new vistas and questions. **Eur, J Immunol (41)2470-2525**

Mantovani, A; Allavena, P; Sica, A; Balkwill, F, 2008. Cancer related inflammation. **Nature (24) 436-44**

Martin, S; Parton, R. G.; 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. Nature reviews. **Molecular cell biology Ed 7(5) 373-78**

Megyeri, P; Pabst, K.M; Pabst, M.J, 1995. Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. **Immunology (4)629-35**

Melo, R. C, 2008. Acute Heart Inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by Trypanosoma cruzi infection. **J Cell Mol Med**

Melo, R.C.N, 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue cell (35)59-67**

Melo, R.C.N,2011. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. **Methods In Molecular Biology Clifton Nj (689)149-161**

Melo, R.C; Sabban, A; Weller, P.F, 2006. Leukocyte lipid bodies: inflammation-related organelles are rapidly detected by wet scanning electron microscopy. **J Lipid Res 11 (47)2589-2594**

Ministério da Saúde, 2002. Acessado em 08/05/2014. Disponível em: http://www.saude.pb.gov.br/web_data/saude/cancer/aula11.pdf

Mitchell, M; Armstrong, D.T, Robker, R.L; Norman, R.J, 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. **Rev Reproduction (5)583-597**

Moreira, L.S.; 2007. Estudo da modulação de corpúsculos lipídicos em células epiteliais. Tese de Mestrado Fundação Oswaldo Cruz.

Moschos, S; Chan, J.L; Mantzoros, C.S, 2002. Leptin and reproduction: a review. **Rev Fertil Steril (3) 433-44**

Mota G.R; Zanesco A, 2007. Leptina, ghrelina e exercício físico. **Arq Bras Endocrinol Metab (1)25-33**

Murphy, D.J, 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Prog Lipid Res (40) 325-438**

Muriel, P, 2009. NF-KB in liver diseases: a target for drug therapy. **J Appl Toxicol. (2)91-100**

Odegaard, J.I; Ricardo-Gonzalez, R.R; Red Eagle, A; Vats, D; Morel, C.R; Goforth, M.H; Subramanian, V; Mukundan, L; Ferrante, A.W; Chawla, A, 2008. Alternative M2 activation of Kupfler cells by PPAR delta ameliorates obesity-induced insulin resistance. **Cell Metabolism (7) 496-507**

Ohri, C.M; Shikotra, A; Green, R.H; Walter, D.A; Brading, P, 2009. Macrophages within NSCLC tumor islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. **Eur. Respir. J (33) 118-126**

Oliveira, T.M; Elias, J.J; Melo, A.F; Teixeira, S.R; Filho, S.C; Gonçalves, L.M; Faria, F.M; Tiezzi, D.G; Andrade, J.M; Muglia, V, 2014. Evolving concepts in breast lobular neoplasia and invasive lobular carcinoma, and their impact on imaging methods. **Insights Imagin**

Ortis, J.N.M, 2007. Adiponectina, TNF-alfa e IL-6 em pacientes portadores de obesidade grave. Relação com a sensibilidade à insulina e com a tolerância a glicose. Dissertação de mestrado UNICAMP

Orosz, P; Echtenacher, B; Falk, W; Ruschoff, J; Weber, D; Mannel, D.N, 1993. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. **J Exp Med. (5)1391-8**

Pacheco, P. et al, 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **The Journal of Immunology (169)6498-6506**

Pae, H.O; Jeong, S.O; Kim, H.S; Kim, S.H; Song, Y.S; Kim, S.K, 2008. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher metabolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophages activated with LPS. **Mol Nutr Food Res (9)1082-91**

Park, E.J; Lee, J.H; Yu, G.Y; He, G; Ali, S.R; Holzer, R.G, 2010. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell (2)197-208**

Portal de Oncologia, Português. O cancro da mama, 2012. Acesso em 31 de janeiro de 2015. Disponível em <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/o-cancro-da-mama.html>.

Prado, W.L; Lofrano, M.C; Oyama L,M; Damaso, A.R, 2009. Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription. **Revista Bra Med Esporte. Ed 15(5) 378-83**

Prins, J.B, 2002. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Pract Res ClinEndocrinol Metab (4)639-651**

Ramos, A.V, 2012. Obesidade como fator de risco para câncer. *Oncológica*. Acesso 20 de maio de 2014. Disponível em <http://www.cancerinfo.com.br/artigo/a-obesidade-como-fator-de-risco-para-cancer.html>

Rahman, I; Biswas, S.K; Kirkham, P.A, 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem Pharmacol (11)1439-52**

Renehan, A.G; Tyson, M; Egger, M; Heller, R.F; Zwahlen, M, 2008. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Rev Lancet (9612)569-78**

Robenek, M.J; Severs, N.J; Schlattmann, K; Plenz, G; Zimmer, K.P; Troyer, D; Robenek, H, 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. **The FASEB journal (7)866-68**

Roth, W; Isenmann, S; Nakamura, M, 2001. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. **Cancer Research (61)2759-65.**

Schipper, H.S; Prakken, B; Halkhoven, E; Boes, M, 2012. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Triends Endocrinol Metabolism, Ed 28(8)407-15**

Shurin, M.R; Salter, R.D.; 2009. Dendritic cells in Cancer. **1a. Ed. Springer**

Singh, S; Aggarwal, B.B, 1995. Activation of transcription factor nfkappa-b is suppressed by curcumin (Diferuloylmethane). **J Biol Chem (42)24995-25500**

Steinman, R.M. Dendritic cells: understanding immunogenicity, 2007. **Eur. J. Immunol (37) 53-60**

Stopeck e Alison. Breast cancer, 2014. Acesso em 31 de janeiro de 2015. Disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview#aw2aab6b2b2>.

Stuedal, A; Ursin, G; Veierod, M.B; Bremnes, Y; Reseland, J.E; Drevon, C.A, 2006. Plasma levels of leptin and mammographic density among postmenopausal women: a cross-sectional study. **Breast Cancer Res (8)55**

Tauchi-Sato, K; Ozeki, S; Houjou, T; Taguchi, R; Fujimoto, T, 2002. The surface of lipid droplets Is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of biological chemistry Ed 277(46)4507-12**

Tilg, H; Moschen, A.R, 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Immunol (10)772-83**

Tomas-Barberen, F.A; Clifford, M.N, 2000. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric. (7)1073-80**

Tracey, D; Klareskog, L; Sasso, E.H; Salfeld, J.G; Tak, P.P, 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacol Ther (2) 244-279**

Trayhurn, P; Wood, I.S, 2005. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans 2005 (33)1078-1081**

Triggiani, M; Oriente, A; Crescenzo, G; Marone, G, 1995. Metabolism of lipid mediators in human basophils and mast cells. **Chem Immunol (61)135-47**

Triggiani, M; Oriente, A; Crescenzo, G; Rossi, G; Marone, G, 1995. Biochemical functions of a pool of arachidonic acid associated with triglycerides in human inflammatory cells. **Int Arch Allergy Immunol (3)261-3**

Triggiani, M; Oriente, A; Seeds, M.C; Bass, D.A; Marone, G; Chilton, F.H, 1995. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. **J Exp Med. (182)1181-90**

Tsujii, M; Kawano, S; Tsuji, S; Sawaoka, H; Hori, M; Dubois, R. N, 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell, Cambridge (93)705-16**

Unicef-UNDP. Work bank; WHO, 2013. Special Programme for Research and training in Tropical disease. Chaga's disease. Disponível em <http://who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>. Acesso em 31 de agosto de 2014

Vakkila, J; Lotze, M.T, 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nature Rev Immunol (4)641-8**

Valsassina, Maria, 2002. Carcinoma inflamatório da mama, 2002. **Acta médica portuguesa. 461-464**

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel), 2014. Acesso em 02 de abril de 2015. Disponível em <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/morbidade/Lancamento-Vigitel.pdf>

Vigitel, 2014. Estimativa sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2013. **Série G. Estatística e informações de saúde 1ª edição**. Acesso em 01 de abril de 2015. Disponível em <https://biavati.files.wordpress.com/2014/05/vigitel-2013.pdf>

Volp, A.C; Alfenas, R.C; Costa, N.M; Minim, V.P; Stringueta, P.C; Bressan, J, 2008. Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metabol. (3)537-49**

Vona-Davis, L; Rose, D.P, 2009. Angiogenesis, adiponekines and breast câncer. **Cytokine & Growth Factor Reviews (20)193-201**

Wang, W; Dubois, R.N, 2004. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America (101)415-416**

Wang, F; Arum, P; Friedgman, J; Chen, Z; Van, W.C, 2009. Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. **Cur Opin Pharmacol (4) 389-85**

Weller, P. F; Monahan-Earley, R. A; Dvorak, H. F; Dvorak, A. M, 1991. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. **The American journal of pathology Ed 138(1)141-48**

Weller, P.F; Dvorak, A.M, 1994. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. **J Allergy Clin Immunol. (6 Pt 2)1151-6**

Wenzel, E; Somoza, V, 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Mol Nutr Food Res. (5)472-81**

Wheisberg, S.P; McCann, D; Desai, M; Rosenbaum, M; Leibel, R.L; Ferrante, A.W.Jr.; 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of clinical Investigation (112)1976-808**

Whiteside, T.L, 2009. Tricks tumors use to escape from immune control. **Oral Oncol (10) 119-23**

Xu, H; Barnes, G.T; Yang, Q; Tan, G; Yang, D; Chou, C, J; Sole, J; Nichols, A; Ross, J.S; Tartaglia, L.A; Chen, H, 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation Ed 112(12) 1821-30**

Xu, H e cols, 2002. Exclusive addition transmembrane TNF- α in adipose tissue leads to, reduced adipose mass and local, but not systemic insulin resistance. **Endocrinol (143) 1502-511.**

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

Yao, M; Tabuchi, H; Nagashima, Y; Baba, M; Naka Igawa, N; Ishiguro, H; Hamada, K; Inayama, Y; Kishida, T; Hattori, K; Yamada-Okabe, H; Kubota, Y.; 2005. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. **The Journal of pathology, Ed 205(3) 377-87**

Ye, J; Gao, Z; Yin, J; He, Q, 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab (293)1118-1128**

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