



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariana Renovato Martins

**Caracterização da expressão gênica das subpopulações de monócitos
CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ na obesidade**

Rio de Janeiro

2012

Mariana Renovato Martins

**Caracterização da expressão gênica das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻,
CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ na obesidade**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientadora: Prof.^a Dra. Simone Vargas da Silva

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M386 Martins, Mariana Renovato.
Caracterização da expressão gênica das subpopulações de monócitos
C14+ CD16-, CD14+CD16+ e CD14dim CD16+ / Mariana Renovato
Martins. - 2012.
113 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo.
Coorientadora: Simone Vargas da Silva.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto
de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biociências.

1. Obesidade – Teses. 2. Monócitos - Teses. 3. Cirurgia bariátrica -
Teses. 4. Antígenos CD14. 5. Expressão gênica. I. Barja-Fidalgo, Thereza
Christina. II. Silva, Simone Vargas da. III. Universidade do Estado do Rio
de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese.

Assinatura

Data

Mariana Renovato Martins

**Caracterização da expressão gênica das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻,
CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ na obesidade**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Simone Vargas da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Eliete Bouskela

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Denise Pires de Carvalho

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha querida família

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Christina Barja-Fidalgo por toda atenção, dedicação, orientação e, sobretudo, paciência.

À Dr^a. Simone Vargas, por ter me co-orientado nesta tese, pelas discussões científicas e sobretudo por ter me apoiado nesses 4 anos (Foram tantas tentativas).

Às Prof^{as} Karine Clément, Catherine Sautes-Fridmann, Isabelle Cremmer e Christine Poitou por acreditarem no meu trabalho e pela oportunidade de aprendizado no meu doutorado sanduíche.

À Estelle Deevre, por toda a ajuda com os experimento de “sorting” e também pela amizade e apoio na França.

À Dr^a. Iolanda Margherita Fierro por sempre estar solícita e pela ajuda nas discussões científicas.

À Fernanda, pela possibilidade de trabalho com as crianças “obesinhas”.

À amiga Carolina por estar do meu lado em vários momentos difíceis do meu doutorado.

Aos amigos de laboratório: Pedro, Edward, Roberta, Gabi, Renatinha, Heitor, Amendola, Rafael, Cristiane, Marta, Andreza, Vany, Maria Augusta, Genilson, Renata.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório, que estão sempre nos dando uma mãozinha.

À Sharon por estar comigo durante todos os momentos da escrita da presente tese.

Ao Marquês, pela possibilidade de diminuir o estresse lhe dando um super abraço.

À Alessandra pela ajuda no meu autoconhecimento.

A todos os amigos brasileiros que fiz na França, a amizade de vocês foi essencial para o rendimento do meu trabalho.

Aos meus pais, responsáveis por tudo que sou. Espero um dia poder retribuir, pelo menos um pouco, todo amor que recebi durante minha vida. Minha prioridade é a felicidade de vocês. Às minhas irmãs pelo apoio e cumplicidade.

Ao meu marido, João, que sempre esteve ao meu lado, nos bons e maus momentos, por me aturar nos momentos de estresse e por me ajudar sempre. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

No meio de qualquer dificuldade
encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

RESUMO

MARTINS, Mariana Renovato. *Caracterização da expressão gênica das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ na obesidade*. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A obesidade é definida como um acúmulo de gordura normal ou excessivo capaz de comprometer a saúde. Sabe-se que a mesma é uma condição inflamatória de baixo grau caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, o que contribui para o processo inflamatório. Nesse contexto os macrófagos do tecido adiposo (ATM) secretam diversos fatores e são polarizados nos fenótipos pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2). A maioria dos ATMs deriva de monócitos circulantes e desta forma destaca-se o importante papel dos monócitos nesse quadro de inflamação de baixo-grau. Recentemente, três subpopulações de monócitos foram identificadas: Os CD14⁺CD16⁻ (MC), os CD14⁺CD16⁺ (MI) e os CD14^{dim} CD16⁺ (MNC). Estudos têm demonstrado um aumento nos monócitos CD16⁺ (MNC e MI) em doenças inflamatórias em humanos. Recentemente, foi demonstrado que o aumento nos monócitos CD16⁺ também acontece na obesidade e diminui após a perda de peso. No presente trabalho apresentamos uma parte dos dados que demonstraram que as frequências dos monócitos MI e MNC estão aumentadas em obesos e diminuem com a perda de peso (Poitou e col, 2011). Além disso, caracterizamos o perfil de expressão gênica das subpopulações de monócitos na obesidade e sugerimos, pela primeira vez, que o meio condicionado do adiposo induz a diferenciação dos monócitos clássicos em monócitos CD16⁺. Ademais caracterizamos a frequência das três subpopulações de monócitos em crianças obesas e com sobrepeso. Os monócitos MC, MI e MNC de 6 indivíduos obesos (OB) antes e 3 meses após o by-pass gástrico (OB/AC), 6 indivíduos com diabetes do tipo II e 7 indivíduos eutróficos foram purificados por citometria de fluxo. As expressões de diversos genes envolvidos nos processos de migração, adesão, fagocitose e produção de citocinas e quimiocinas foram analisadas através da técnica de microarranjo. Observamos um aumento na frequência dos monócitos CD16⁺ nos indivíduos adultos obesos e obesos com diabetes, os quais estavam diminuídos três meses após a perda de peso. As expressões gênicas de CX3CR1 e de TLR8 estavam aumentadas nos monócitos MC, MI e MNC do grupo OB e diminuíram após a cirurgia. As três subpopulações de monócitos apresentaram perfis de expressão gênica diferentes no grupo OB comparado com o grupo C: os monócitos MNC expressaram níveis elevados de CSF1R, SELPLG, TLR4, TNF α e IL1 β , os monócitos MI se caracterizaram pela expressão aumentada de CCR2, CX3CR1, CCR5 TNF α e MCP1 e os monócitos CD14⁺CD16⁻ apresentaram níveis elevados de CCR2, CX3CR1, CD36 e TLR4. Nossos resultados demonstraram que os monócitos CD14⁺CD16⁻ podem se diferenciar em monócitos CD16⁺ quando estimulados com o meio condicionado do tecido adiposo visceral, sugerindo uma função primordial do tecido adiposo no aumento da frequência desses monócitos durante a obesidade. As três subpopulações apresentam padrões diferentes de expressão gênica de moléculas envolvidas na migração, adesão e inflamação. Nesse contexto CX3CR1 e TLR8 podem ser considerados como uma assinatura molecular refletindo as funções monocitárias alteradas na obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Subpopulações de monócitos. CX3CR1. TLR8. Cirurgia bariátrica.

ABSTRACT

MARTINS, Mariana Renovato. *Genic characterization of monocytes subpopulations CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ during obesity*. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Obesity is a low-grade inflammatory state characterized by excessive accumulation of adipose tissue which contributes to inflammatory process. Adipose tissue macrophages (ATMs) secrete different factors and are polarized into pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) phenotypes. Most of the ATMs derive from circulating monocytes, so monocytes play an important role in this low-grade inflammatory condition. In recent years, three subsets of monocytes have been identified: The CD14⁺CD16⁻ (CMI), the CD14⁺CD16⁺ (IM) and the CD14^{dim}CD16⁺ (NCM). Studies have shown an increase in CD16⁺ (CD14⁺CD16⁺ and CD14^{dim}CD16⁺) subset in human inflammatory chronic pathologies. Recently, it was demonstrated an increase in CD16⁺ subsets in obesity decreasing after weight loss. Here, we show a set of data of the increased percentages and numbers of IM and NCM in obese subjects that decreased with weight loss (Poitou et al. 2011), and characterize gene expression profile of the monocyte subpopulations in obesity and suggest for the first time that the secretion derived from the obese adipose tissue induces the differentiation of CM into CD16⁺ monocytes. Furthermore we characterize the frequencies of the three monocytes subpopulations in obese and overweight children. The CM, IM and NCM of 6 obese subjects (OB) before and three-month after the gastric bypass, 6 obese subjects with type II diabetes (OB/D) and 7 lean subjects (C) were sorted by flow cytometry. The expression of several genes involved in monocyte functions (migration, adhesion, phagocytosis and cytokines production) was analyzed by Low Density Array. We observed an increase in the frequency of CD16⁺ monocytes in obese and diabetic obese subjects which decreased three months after the weight loss. The gene expression of CX3CR1 (fractalkine receptor) and of TLR8 (Toll Like Receptor 8) was highly increased in the CM, IM and NCM of the OB group and decreased after surgery. The three subsets displayed different gene expression profiles in the OB group compared to the C group: the NCM expressed high levels of CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 receptor), TLR4, SELPLG (selectin P ligand) TNF α and IL1 β , the IM were characterized by over-expression of CCR2, CX3CR1, CCR5, TNF α and MCP1 and the CM expressed high levels of CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) and CD36. Our results showed that CD14⁺CD16⁻ monocytes can differentiate into CD16⁺ monocytes when stimulated with the conditioning media of visceral adipose tissue, suggesting a pivotal role for adipose tissue in the increased frequency of these monocytes during obesity. The three subpopulations display different gene expression patterns of molecules involved in migration, inflammation and antibody capture. CX3CR1 and TLR8 could be considered as a molecular signature reflecting modified functions of monocytes in obesity.

Keywords: Obesity. Monocytes subpopulations. CX3CR1. TLR8. Gastric bypass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Patogênese dos problemas relacionados com a obesidade.....	19
Figura 2 –	A obesidade no mundo.....	20
Figura 3 –	Evolução da obesidade em adultos brasileiros.....	21
Figura 4 –	Evolução da obesidade em adolescentes brasileiros.....	22
Figura 5 –	Evolução da obesidade em crianças brasileiras.....	23
Figura 6 –	Moléculas liberadas pelo tecido adiposo.....	27
Figura 7 –	Estrutura do tecido adiposo.....	28
Figura 8 –	As múltiplas funções do tecido adiposo.....	29
Figura 9 –	Representação esquemática dos fatores que regulam a polarização de macrófagos e resistência à insulina no tecido adiposo.....	32
Figura 10 –	Alterações celulares no tecido adiposo durante a obesidade.....	33
Figura 11 –	Recrutamento de monócitos para o tecido adiposo.....	34
Figura 12 –	Funções efetoras dos monócitos.....	36
Figura 13 –	Análise das duas subpopulações de monócitos inicialmente caracterizadas.....	38
Figura 14 –	Análise das três subpopulações de monócitos caracterizadas atualmente.....	39
Figura 15 –	Estratégia de purificação das subpopulações de monócitos humanos por FACS “Cell sorting”.....	46
Figura 16 –	Esquema da placa microfluídica de “microarray” TLDA, Applied Biosystems.....	48
Figura 17 –	Estratégias para obtenção dos valores de $\Delta\Delta Ct$ a partir da utilização de genes de referência.....	49
Figura 18 –	Frequência das subpopulações de monócitos em indivíduos adultos eutróficos, obesos, obesos diabéticos, obesos após a cirurgia e obesos diabéticos após a cirurgia.	54
Figura 19 –	Expressão gênica dos monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ de indivíduos obesos.....	55
Figura 20 –	Expressão gênica dos monócitos $CD14^+CD16^+$ de indivíduos obesos.....	56
Figura 21 –	Expressão de CX3CR1 e CCR5 na subpopulação $CD14^{dim}CD16^+$ em	

	indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	59
Figura 22 –	Expressão de CSF1R e SELPLG na subpopulação CD14 ^{dim} CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	61
Figura 23 –	Expressão de TNF α e IL1 β na subpopulação CD14 ^{dim} CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	63
Figura 24 –	Expressão de CCR2 e CX3CR1 na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	65
Figura 25 –	Expressão de CCR5 e CSF1R na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	66
Figura 26 –	Expressão de TNF α e CCL2 na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	67
Figura 27 –	Expressão de IL1 β , CCL3 e IL10 na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	68
Figura 28 –	Expressão de CCR2, CX3CR1, CSF1R e CCR5 na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁻ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	70
Figura 29 –	Expressão de CD36 e SELPLG na subpopulação CD14 ⁺ CD16 ⁻ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	71
Figura 30 –	Expressão de TLR4 três subpopulações de monócitos em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	73
Figura 31–	Expressão de TLR8 três subpopulações de monócitos em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso.....	74
Figura 32 –	Expressão de PPAR γ nas três subpopulações de monócito em indivíduos eutróficos, obesos e obesos diabéticos.....	75
Figura 33 –	Diferenciação de monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁻ em monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Alofococianina
APS	Adipsina
C	Controle
CSF	Fator Estimulador de Colônia
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindônio
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DVB	Doença da Vesícula Biliar
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HPSC	Células Tronco Hematopoiéticas
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IKK	Quinase de IKB
IL	Interleucina
IFN γ	Interferon-gama
IGg	Imunoglobulina G
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína Lipase
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócito 1
MDP	Precursor comum de monócitos, macrófagos e células dendríticas
NEFA	Ácidos graxos não esterificados

NO	Óxido Nítrico
OB	Obeso
OB/D	Obeso Diabético
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	Plasminogênio Ativado
PBMC	Células Mononucleares Periféricas do Sangue
PDC	Células Dendríticas Plasmocitóides
PE	Isotiocianato de Fluoresceína
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta endotelial
PGE ₂	Prostaglandina E 2
PKC	Proteína Quinase C
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR	Receptor ativado por proliferadores do peroxisoma
RBP4	Proteína Ligante de Retinol
RI	Receptor de Insulina
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RYGB	<i>By-pass</i> gástrico em Y de Roux
SOB	Crianças com sobrepeso
TA	Tecido Adiposo
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVO	38
1.1	Objetivo geral	38
1.2	Objetivos específicos	38
1.2.1	<u>Caracterizar por citometria de fluxo, a frequência dos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ com base na expressão dos receptores CD14 e CD16</u>	38
1.2.2	<u>Verificar a expressão gênica de diversos genes relacionados a processos migratórios, de adesão e inflamação através da técnica de microarranjo a partir das seguintes comparações</u>	38
1.2.3	<u>Verificar o efeito do meio condicionado do tecido adiposo visceral sobre monócitos CD14⁺CD16⁻</u>	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1	Pacientes	39
2.2	Isolamento das células mononucleares e posterior enriquecimento em monócitos	40
2.3	Citometria de Fluxo	40
2.4	Seleção (sorting) das subpopulações de monócitos	41
2.5	Extração de RNA	42
2.6	Quantificação de RNA	43
2.7	Transcrição reversa e amplificação do DNA complementar	43
2.8	Reação da polimerase em cadeia (PCR)	44
2.9	Cultura de explantes de tecido adiposo visceral	44
2.10	Tratamento de monócitos com sobrenadante de tecido adiposo visceral	46
2.11	Análise Estatística	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Características bioquímicas e laboratoriais e distribuição das subpopulações de monócitos dos indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos diabéticos para os quais houve caracterização de expressão gênica	47
3.2	Monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ estão aumentados na obesidade, e diminuem após a perda de peso provocada por cirurgia	

	bariátrica.....	48
3.3	Perfil de expressão de genes associados aos processos de migração, adesão e produção de citocinas nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ e CD14⁺CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ de indivíduos obesos.....	49
3.3.1	<u>Perfil de expressão gênica dos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ na obesidade.....</u>	50
3.3.2	<u>Perfil de expressão gênica dos monócitos CD14⁺CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ na obesidade.....</u>	51
3.4	Impacto da cirurgia bariátrica sobre a expressão gênica de receptores para citocinas e quimiocinas nos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺ em indivíduos adultos obesos.....	53
3.4.1	<u>Análise da expressão gênica nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺.....</u>	54
3.4.1.1	Comparação da expressão gênica de CX3CR1 e CCR5 nos monócitos CD14 ^{dim} CD16 ⁺ de indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após a cirurgia.	54
3.4.1.2	Comparação da expressão gênica de CSF1R e SELPLG nos monócitos CD14 ^{dim} CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	56
3.4.1.3	Comparação da expressão gênica de TNF α e IL1 β nos monócitos CD14 ^{dim} CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	57
3.4.2	<u>Análise da expressão gênica nos monócitos CD14⁺CD16⁺.....</u>	60
3.4.2.1	Comparação da expressão gênica de CCR2 e CX3CR1 nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	60
3.4.2.2	Comparação da expressão gênica de CCR5 e CSF1R nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	61
3.4.2.3	Comparação da expressão gênica de TNF α e CCL2 nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	62
3.4.2.4	Comparação da expressão gênica de IL1 β , CCL3, IL10 nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	63
3.4.3	<u>Análise da expressão gênica nos monócitos CD14⁺CD16⁻.....</u>	64

3.4.3.1	Comparação da expressão gênica de CCR2, CX3CR1, CCR5 e CSF1R nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	64
3.4.3.2	Comparação da expressão gênica de CD36 e SELPLG nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	66
3.4.4	<u>Análise da expressão gênica de TLR's nos monócitos CD14^{dim}CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD16⁻.....</u>	67
3.4.4.1	Comparação da expressão gênica de TLR4 nos monócitos CD14 ^{dim} CD16 ⁺ , CD14 ⁺ CD16 ⁺ e CD14 ⁺ CD16 ⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	67
3.4.4.2	Comparação da expressão gênica de TLR8 nos monócitos CD14 ⁺ CD16 ⁻ , CD14 ⁺ CD16 ⁺ e CD14 ^{dim} CD16 ⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia.....	69
3.4.5	<u>Comparação da expressão gênica de PPARγ nos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos diabéticos.....</u>	75
3.5	Efeito do sobrenadante secretado pelo tecido adiposo visceral sobre o fenótipo de monócitos CD14⁺CD16⁻.....	70
4	DISCUSSÃO.....	73
	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE – Artigo publicado.....	102

INTRODUÇÃO

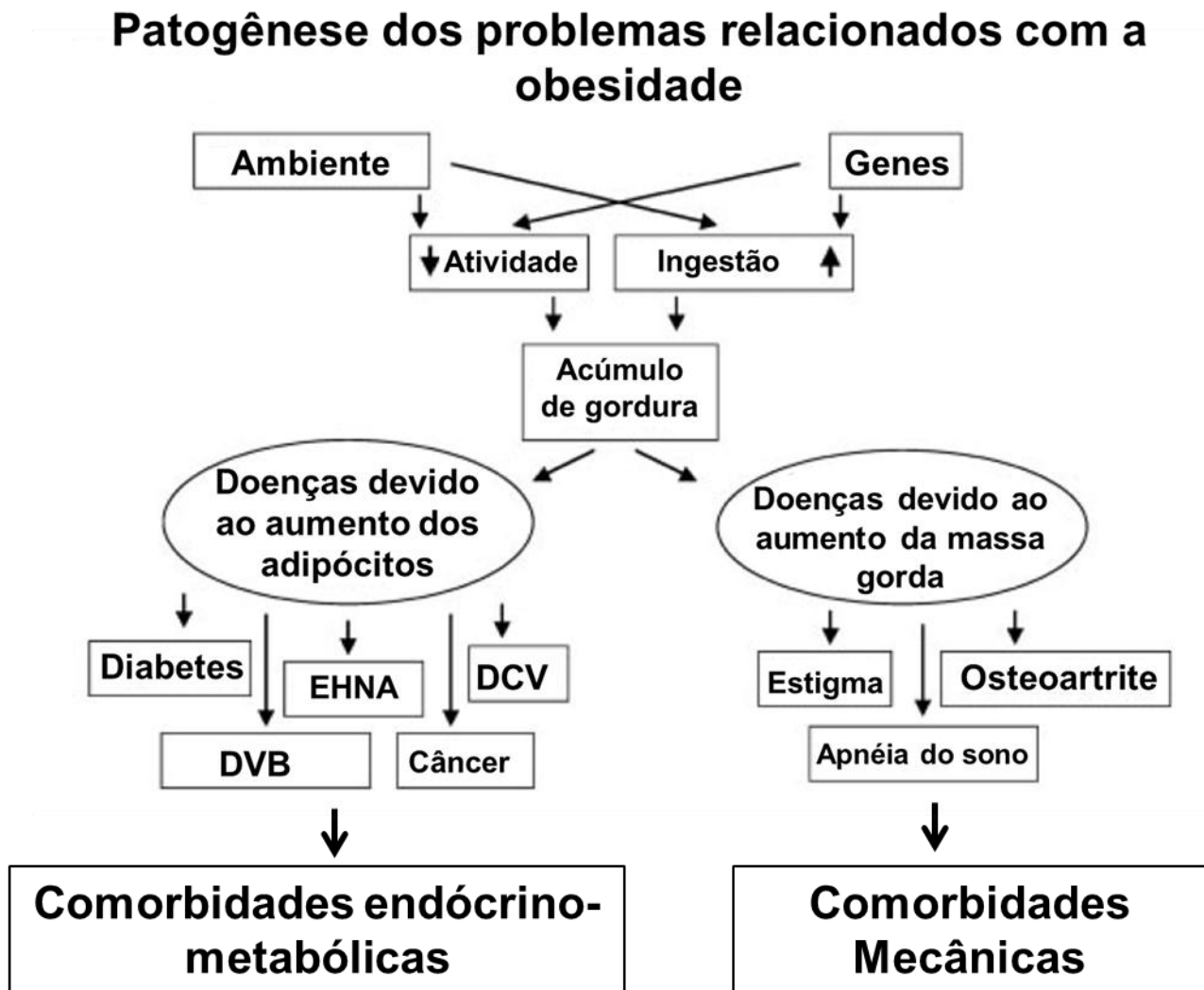
Obesidade

A obesidade é atualmente um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, pois se associa diretamente com a redução da expectativa de vida e impacta, substancialmente, os cofres públicos através do aumento dos custos gerados nos sistemas de saúde (Bray GA, 2004; Organização Mundial de Saúde - OMS, 2011). Além disso, tal preocupação se baseia no fato da mesma se constituir no principal fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, desordens da musculatura esquelética e alguns tipos de câncer (Bray, 2004; OMS, 2011) (Figura 1). Indivíduos obesos apresentam, no mínimo, duas vezes mais chances de desenvolvimento de diabetes, resistência à insulina, dislipidemia, apnéia do sono, hipertensão, doença coronariana, osteoartrite e gota (OMS, 1997).

Inicialmente a obesidade era uma doença considerada comum apenas em países desenvolvidos, porém, nos últimos anos emergiu como uma epidemia global (Flegal e col., 2002). Dados da OMS demonstram que um bilhão e quinhentas mil pessoas com mais de vinte anos apresentam sobrepeso ou obesidade. E destas, mais de duzentos milhões de homens e trezentos milhões de mulheres são obesos (OMS, 2011) (Figura 2). Nos Estados Unidos, por exemplo, onde a taxa de obesidade dobrou de 1960 a 2000 estima-se que mais de 66% dos adultos estejam em um desses estágios (Aronne e col., 2009). Até mesmo na França, que é frequentemente considerada como um país protegido da obesidade, estima-se que a mesma alcance 14,5% da população com mais de 15 anos, tendo aumentado de 5 para 10% entre a década de 90 e os anos 2000 (Clément, 2011).

No Brasil dados vem mostrando um aumento contínuo da obesidade em adultos de 2006 a 2009 – de 11,4% para 13,9%. A mais recente pesquisa nacional sobre antropometria, realizada em 2008–2009, confirma a tendência do aumento na prevalência da obesidade, acometendo 14,8% dos indivíduos com 20 anos de idade ou mais (IBGE, POF, 2008-2009; Vigitel, 2009) (Figura 3).

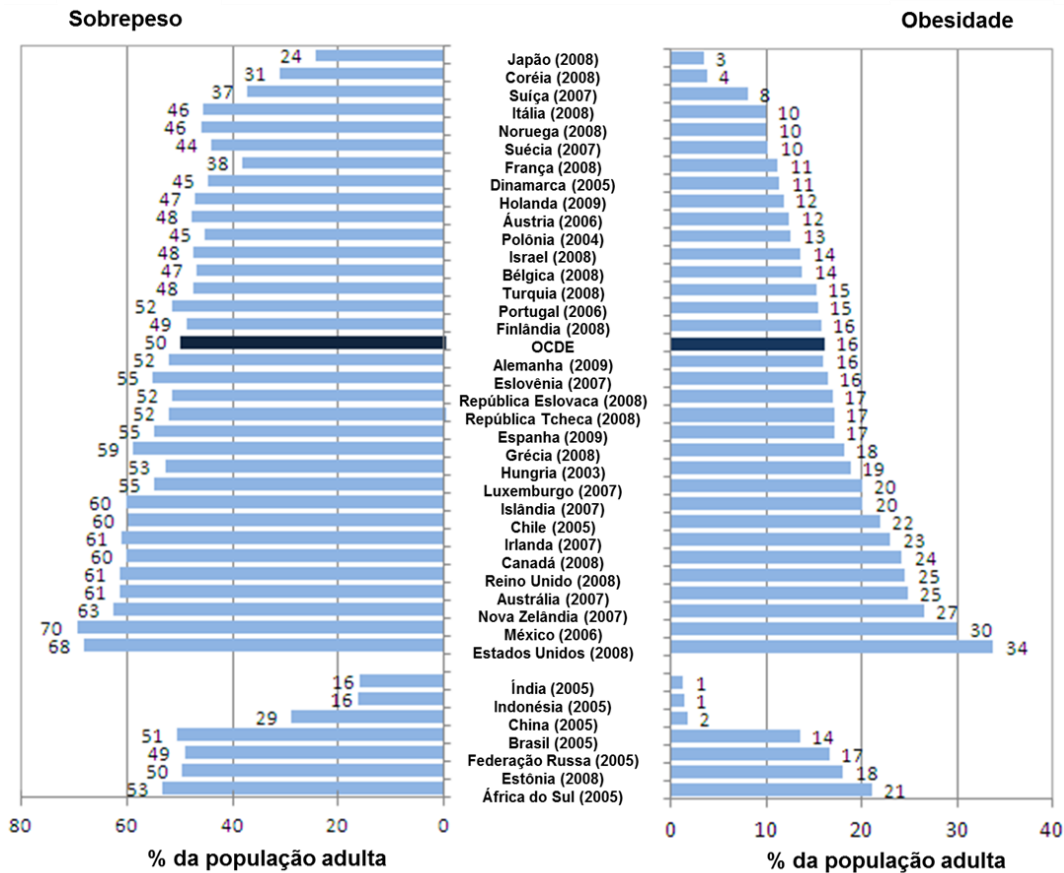
Figura 1 - Patogênese dos problemas relacionados com a obesidade



Legenda: A obesidade produz uma miríade de problemas de saúde relacionados. Os quais se relacionam tanto com o aumento da massa gorda quanto com o aumento da secreção de peptídeos pelos adipócitos hipertrofiados. DCV - doença cardiovascular; EHNA - esteatose hepática não alcoólica; DVB - doença da vesícula biliar.

Fonte: Adaptado de Bray, 2004.

Figura 2 - A obesidade no mundo



Legenda: Prevalência de pessoas com obesidade e sobrepeso por país

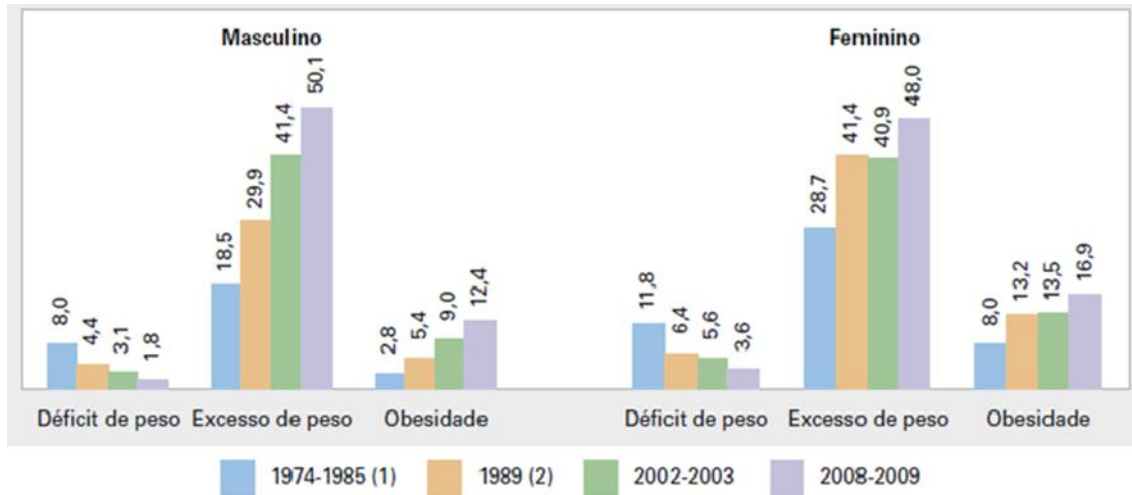
Fonte: Organização para a cooperação e o desenvolvimento econômico, 2011.

Somando-se ao fenômeno observado em adultos, pesquisas recentes demonstraram que a prevalência da obesidade e do sobrepeso na população jovem cresce em níveis epidêmicos. Em 2004, cerca de 17% dos jovens americanos apresentavam sobrepeso e outros 16,5% encontravam-se em uma zona de risco elevada para o desenvolvimento do mesmo (Ogden e col., 2006). Ainda pior, não só os jovens adolescentes como também as crianças apresentam alarmantes taxas de obesidade em diferentes países do mundo como, por exemplo: Reino Unido, Austrália e China (Popkin e col., 2006).

Tal fato também pode ser observado no Brasil, onde o número de meninos e meninas adolescentes com excesso de peso dobrou entre o período de 1975 a 1989, crescendo ainda mais entre 1989 a 2003 em meninos do que em meninas. Contudo, ainda que o aumento da prevalência de excesso de peso tenha sido similar para ambos os sexos em todos os grupos de renda, nos dados obtidos de 1975 a 2003 observou-se que com a modificação da renda

familiar, e a tendência de estabelecimento e a intensidade de aumento de peso, ao longo do tempo, deslocando-se em direção às pessoas mais pobres (IBGE, POF, 2008-2009; Vigitel, 2009) (Figura 4).

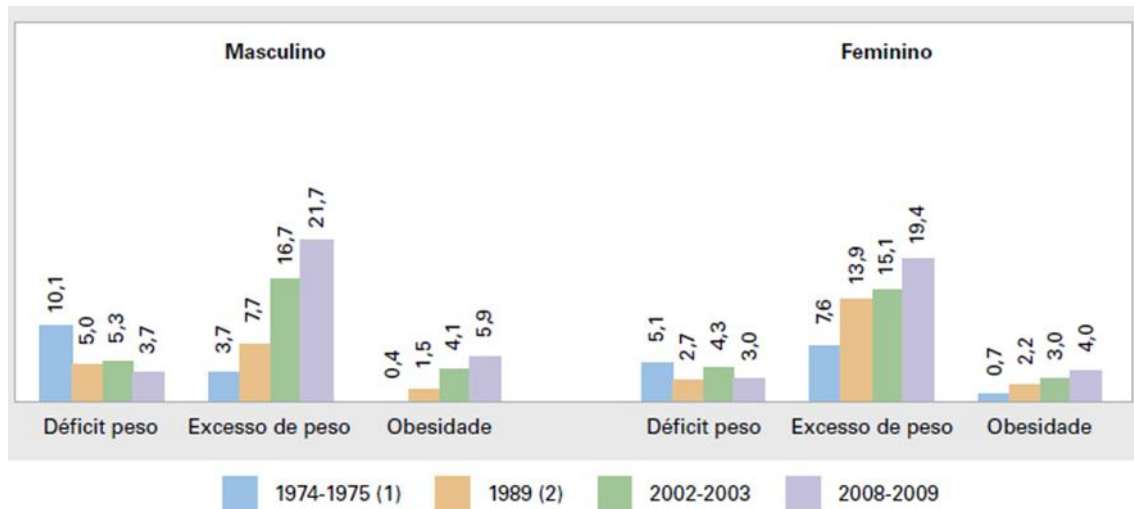
Figura 3 - Evolução da obesidade em adultos brasileiros



Legenda: Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade, na população com 20 anos ou mais de idade, por sexo- Brasil períodos 1974-1975, 1989 e 2002-2003 e 2008-2009.

Fonte: IBGE POF, 2008-2009.

Figura 4 - Evolução da obesidade em adolescentes brasileiros



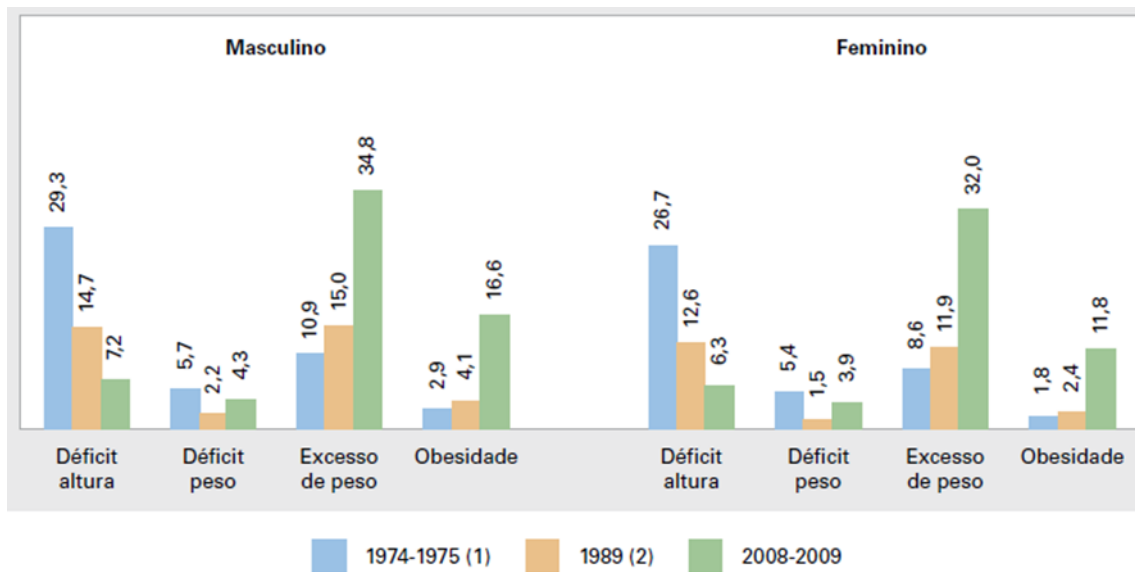
Legenda: Evolução de indicadores antropométricos na população com 10 a 19 anos ou mais de idade, por sexo- Brasil períodos 1974-1975, 1989 e 2002-2003 e 2008-2009.

Fonte: IBGE POF, 2008-2009.

Em termos de Saúde Pública, ao atingir diversas faixas etárias, a obesidade torna-se, um problema de extrema gravidade. Pesquisas epidemiológicas demonstram que a doença deixou de ser um problema específico de uma determinada faixa etária (adulta) e passou a atingir prematuramente adolescentes e crianças, transformando-se em uma epidemia nestas idades (OMS, 2000). Considera-se que a obesidade infantil seja um dos maiores desafios de saúde pública no século XXI, pois a mesma se constitui em um problema global, cuja prevalência aumenta de forma alarmante. Segundo a OMS mais de 42 milhões de crianças com menos de cinco anos apresentam sobrepeso, com aproximadamente trinta e cinco milhões destas vivendo em países em desenvolvimento (OMS, 2009). No Brasil, por exemplo, em 2009, uma em cada três crianças de 5 a 9 anos de idade apresentava excesso de peso, ou seja, 33,5% das crianças entre cinco a nove anos, sendo que 16,6% dos meninos e 11,8% das meninas já apresentavam obesidade (IBGE, POF, 2008-2009; Vigitel, 2009) (Figura 5). Em crianças e adolescentes, o estabelecimento de um índice único para a determinação do sobrepeso ou obesidade não é uma tarefa fácil, tal fato se dá devido às diversas transformações pelas quais o corpo está passando. Entre os fatores que se relacionam diretamente com o aumento da obesidade infantil estão: redução na atividade física, particularmente pela redução de práticas de educação física nas escolas, fabricação industrial de alimentos, aumento no tamanho das porções e aumento da disponibilidade de fast-foods (Patel e col., 2008). A obesidade precoce se constitui em um fator extremamente preocupante

porque além de se associar a chances aumentadas de morte prematura, crianças que apresentam sobrepeso ou obesidade normalmente se tornam adultos obesos e são mais susceptíveis ao desenvolvimento prematuro de co-morbidades associadas como diabetes e doenças cardiovasculares (OMS, 2009).

Figura 5 - Evolução da obesidade em crianças brasileiras



Legenda: Evolução de indicadores antropométricos na população com 5 a 9 anos ou mais de idade, por sexo- Brasil períodos 1974-1975, 1989 e 2002-2003 e 2008-2009.

Fonte: IBGE POF, 2008-2009.

Há um entendimento geral de que a epidemia da obesidade se estabeleça em uma interação social complexa entre fatores econômicos e comportamentais (Villagra, 2009) que se reflete em números alarmantes, uma vez que sobrepeso e obesidade são diretamente a quinta maior causa de morte no mundo, responsável pela morte de pelo menos dois milhões e oitocentos mil adultos por ano (OMS, 2011). É importante ressaltar que um dos pontos mais alarmantes sobre a epidemia da obesidade se constitui no fato de que suas projeções são extremamente alarmantes, por exemplo, estudos estimam um aumento de 65 milhões de obesos nos Estados Unidos e de 11 milhões de obesos no Reino Unido até o ano de 2030 (Wang e col., 2011).

Vale ressaltar que os efeitos do excesso de peso sobre a morbidade e mortalidade são conhecidos há mais de 2000 anos. É descrito que Hipócrates já reconhecia que “a morte súbita é mais comum naqueles que são naturalmente gordos do que em eutróficos”; e Malcolm

Fleming, em 1760, observou que “a corpulência em um nível extraordinário deveria caracterizar uma doença, uma vez que, em certos excessos impedia o exercício livre das funções dos animais e tenderia ao encurtamento da vida, norteando o caminho para enfermidades perigosas” (Bray, 2004). Além disso, sua ampla distribuição reflete o caráter global de seu desenvolvimento através da incorporação de realidades distintas. Retrato de tal dinâmica se dá através de estudos epidemiológicos que apresentam altas taxas de prevalência de obesidade na Europa, assim como em países da Ásia (Popkin, 2001), norte e sul da África e na América Latina (Puoaane e col., 2002). Desta forma, padrões culturais, étnicos e sócio-econômicos distintos estão envolvidos na geração da obesidade, dificultando o estabelecimento de um fator único de etiopatologia. Ou seja, a multicausalidade constitui em um desafio teórico, assim como um desafio para a formulação de políticas públicas eficazes na sua erradicação.

Nos países em desenvolvimento que recentemente apresentaram uma diminuição nas taxas de desnutrição, o desenvolvimento da obesidade ocorre com grande velocidade. Ou seja, o desnutrido de ontem é o obeso de hoje, através de um processo reconhecido como “Transição Nutricional” (Monteiro e col., 1995). Nesse processo as transformações sócio-econômicas que proporcionam um maior acesso dos indivíduos aos alimentos se relacionam intimamente com o desenvolvimento da obesidade em longo prazo (Sichieri e col., 2000; Monteiro e col., 2007). Nesses casos a obesidade é observada principalmente nos centros urbanos, porém não é incomum encontrarmos obesidade e desnutrição convivendo lado a lado, no mesmo país, na mesma comunidade, ou mesmo na mesma vizinhança (OMS, 2009).

A crise da obesidade tem se destacado pelo fato da OMS tê-la reconhecido como um problema crítico que precisa ser abordado através de uma política de saúde global (Wolf e Woodworth, 2009). Atualmente vem sendo um grande desafio encontrar políticas públicas realmente eficazes no combate da obesidade, pois sua etiopatologia é extremamente complexa. Há consenso em considerar-se que a obesidade é uma doença de origem multifatorial basicamente composta por fatores genéticos, hormonais, nutricionais, ambientais e socioculturais, combinados ainda com estilos de vida da sociedade moderna, caracterizados por nutrição inadequada e a falta de atividade física regular (Lopaschuck e col., 2007). De fato, na sociedade moderna, devido às mudanças nos meios de transporte e também à diminuição do trabalho manual para a obtenção de comida, os indivíduos gastam níveis muito menores de energia do que no passado (Clément, 2011). No Brasil, por exemplo, pesquisas realizadas demonstram uma redução na compra de alimentos tradicionais básicos, como arroz,

feijão e hortaliças, e aumentos notáveis (de até 400%) na compra de alimentos processados, como bolachas e biscoitos, refrigerantes, carnes processadas e pratos prontos (Levy e col., 2009). Não se pode deixar de citar, também, o aumento do tempo em que se passa vendo televisão, o qual é normalmente associado com uma ingestão maior de alimentos de alta densidade energética (Hill e col., 2003). Além disso, a diminuição da duração do sono, sobretudo em decorrência dos altos níveis de estresse e do excesso de trabalho também se associa com o aumento da obesidade (Kuo e col., 2007). Os fatores acima mencionados favorecem um desequilíbrio, o qual resulta na incapacidade de modulação do processo de obtenção, uso e armazenamento de energia (Pi-Sunyer, 2002).

A obesidade e o sobrepeso são definidos como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo capaz de comprometer a saúde, o que nada mais é que o aumento da adiposidade, ou seja, o desenvolvimento anormal do tecido adiposo (Cinti, 2002). Além disso, muitos autores a consideram como um desvio patológico da evolução fisiológica da massa gorda durante as etapas de vida (etapas iniciais do crescimento, puberdade, menopausa, idade, variação sazonal e envelhecimento) (Hill e col., 2003). Nesse contexto, o desenvolvimento anormal do tecido adiposo está intimamente relacionado a um estado inflamatório, o qual se caracteriza pela elevação sistêmica de moléculas com propriedades pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 (Zeyda e Stulnig, 2007). E sendo assim, alterações na produção dessas moléculas por diferentes células do tecido adiposo (TA), como por exemplo, os macrófagos- considerados elementos determinantes na fisiopatologia da obesidade- podem levar a modificações na biologia local do TA, contribuindo para o estabelecimento de várias complicações, dentre elas a resistência à insulina (Steinberg, 2007).

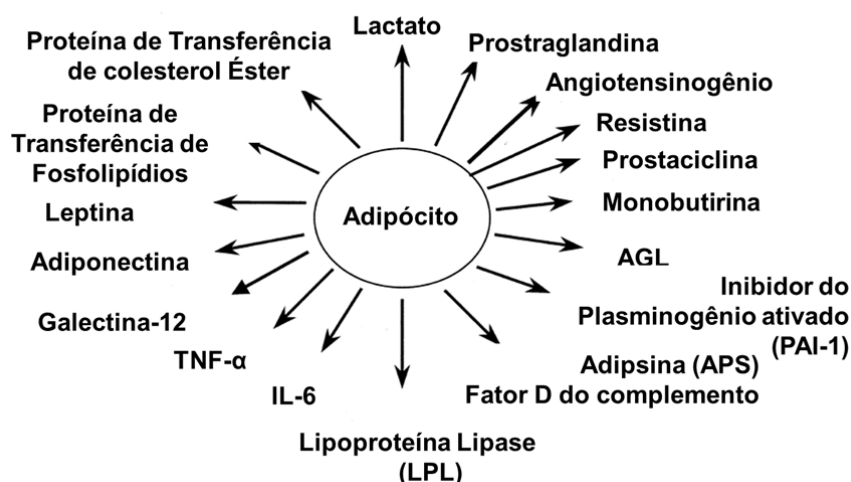
O Tecido adiposo

O tecido adiposo branco é o maior reservatório energético em eucariotos superiores. Ele é capaz de estocar triglicerídeos nos períodos de excesso de energia e mobilizá-lo durante períodos de escassez energética, o que constitui uma de suas funções mais importantes (Gregoire, 2001; Prins, 2002). Em decorrência de sua natureza hidrofóbica os lipídeos podem ser armazenados em grandes quantidades, dispensando a participação da água como solvente e contêm, por unidade de massa, mais do que o dobro de energia armazenada que os outros dois componentes, fornecendo mais energia metabólica quando oxidados. O excesso de energia consumido é convertido em moléculas de triglicerídios que, em situações de necessidade como no jejum, podem ser liberados rapidamente na forma de ácido graxos livres

e glicerol, garantindo assim a manutenção da homeostase (Hanauer, 2004; Havel, 2004). A capacidade de armazenamento energético é virtualmente ilimitada, resultando do aumento das reservas de cada adipócito (favorecimento da lipogênese relativamente à lipólise) e da replicação e diferenciação de pré-adipócitos. A ausência de limite representa vantagem adaptativa em curto prazo, porém se torna desvantajosa em longo prazo, se traduzindo em uma disfunção endócrina/metabólica (Gregoire, 2001; Prins, 2002).

Avanços no entendimento do metabolismo energético têm elucidado novos campos nas funções dos adipócitos. Se outrora o tecido adiposo recebia um status de tecido ser apenas “estocador”, atualmente ele possui uma função muito mais complexa e dinâmica, sendo reconhecido como um órgão multifuncional. Além de seu papel central no estoque de lipídeos, os adipócitos também apresentam uma função endócrina essencial, secretando diversos fatores protéicos bioativos incluindo proteínas “citocina-like”, ou adipocinas, como são denominadas as citocinas secretadas pelo tecido adiposo (Fonseca-Alaniz e col., 2006; Cristancho, 2011) (Figura 6). As adipocinas são capazes de influenciar diversos processos fisiológicos, como por exemplo: controle da ingestão alimentar, homeostase energética, sensibilidade à insulina, angiogênese, proteção vascular, regulação da pressão, coagulação sanguínea, além da modulação do sistema imunológico. Sendo assim, alterações na secreção de adipocinas em consequência da hipertrofia e/ou da hiperplasia dos adipócitos, podem também estar relacionadas com a gênese do processo de obesidade, bem como suas complicações (Havel, 2004).

Figura 6 - Moléculas secretadas pelo tecido adiposo



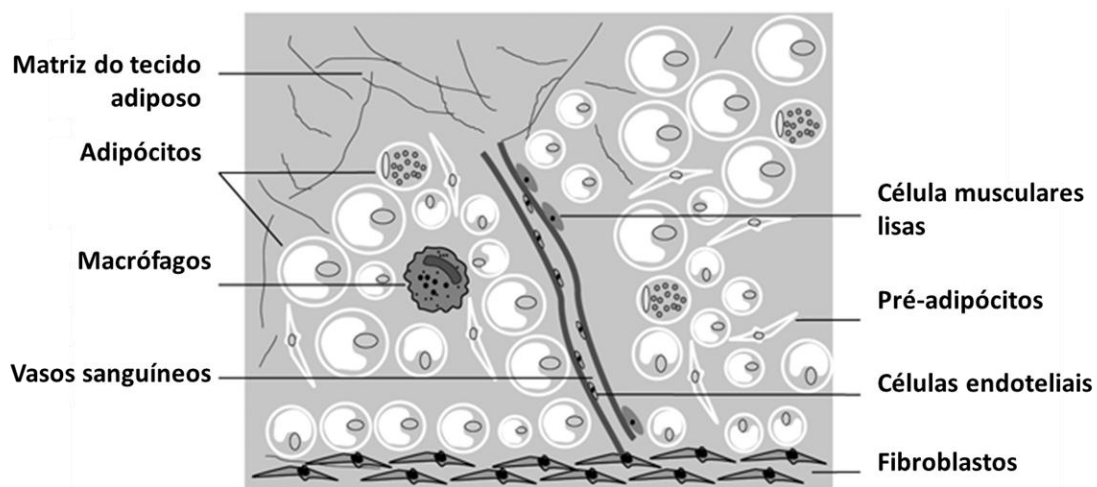
Legenda: O adipócito produz e libera uma grande quantidade de peptídeos e metabólitos que fornecem sinais a partes distantes do corpo relativamente ao tamanho e atividade do tecido adiposo

Fonte :Adaptado de Bray, 2004.

Como órgão secretor, o tecido adiposo apresenta várias particularidades, uma vez que é composto por vários depósitos subcutâneos e viscerais que se encontram dispersos pelo organismo (Cinti, 2005), que não possuem ligação física entre si e cuja atividade secretória é regulada por mecanismos humorais e hormonais não totalmente esclarecidos (Fantuzzi, 2005). O tecido adiposo é primariamente composto de adipócitos, fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais, nervos e células do sistema imune que possuem atividade secretória variável (Fantuzzi, 2005, Cristancho, 2011) (Figura 7).

Responsáveis pela constituição de 50% do tecido adiposo, os adipócitos liberam uma grande quantidade de hormônios protéicos e fatores de sinalização (Trayhurn e Beattie, 2001; Rajala e Scherer, 2003; Trayhurn e Wood, 2004; Rosen e Spiegelman, 2006). Além disso, secretam grandes quantidades de ácidos graxos que são liberados durante períodos de balanço energético negativo (particularmente o jejum), o que reflete a função do tecido adiposo como principal depósito energético. No entanto, os ácidos graxos não constituem a única parcela lipídica secretada pelos adipócitos, pois algumas prostaglandinas e endocanabinóides (PGE₂ e anandamida, respectivamente) também são sintetizados pelos mesmos e acredita-se que esses agentes desempenhem uma importante função na inflamação do tecido adiposo (Trayhurn e col., 2011). Além disso, pode-se destacar o colesterol e o retinol, que apesar de não serem sintetizados no adipócito são estocados e liberados por esse tecido (Trayhurn, 2007).

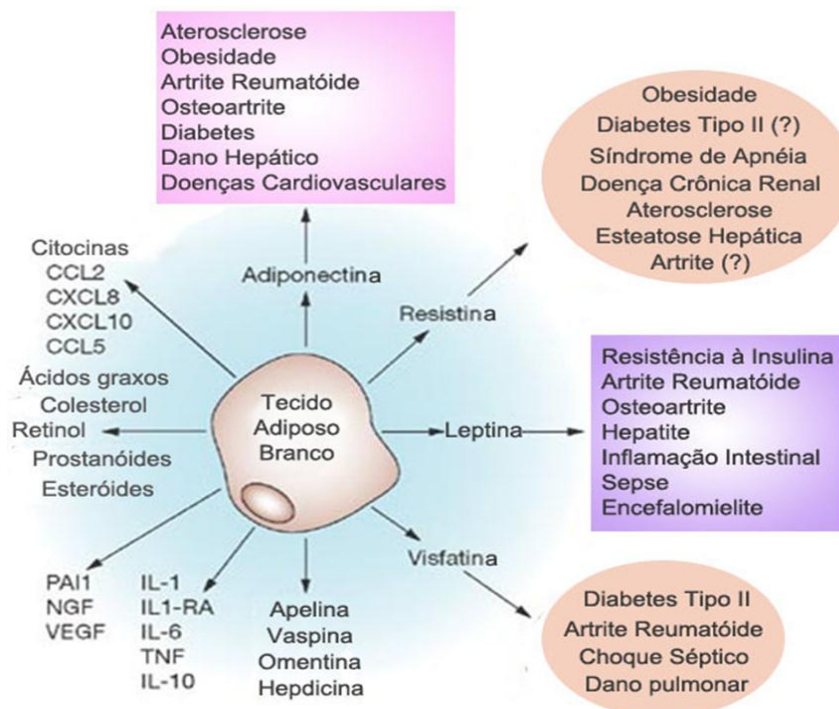
Figura 7 - Estrutura do tecido adiposo



Legenda: Esquema representativo dos compartimentos celulares do tecido adiposo
 Fonte: Adaptado de Schaffler e col., 2005.

Várias evidências demonstram que o tecido adiposo é capaz de secretar múltiplas adipocinas, que influenciam, não apenas, na função adipocitária (função autócrina), mas também em várias vias metabólicas (função parácrina). Levando-se em consideração que o tecido adiposo encontra-se em diversos compartimentos corporais, o somatório desses fatores impacta substancialmente as funções corporais, sobretudo na obesidade, onde o acúmulo excessivo do TA é um fator decisivo para sua caracterização e estabelecimento (Frühbeck e col., 2001; Fonseca-Alaniz e col., 2006, Blüer, 2009; Heber, 2010). Algumas adipocinas como leptina e adiponectina são produzidas exclusivamente (ou ao menos predominantemente) pelo tecido adiposo, enquanto as outras adipocinas, como as citocinas/quimiocinas pró- ou anti-inflamatórias, são tipicamente conhecidas por seu papel nas respostas imunes e adaptativas (Whellen e Hotamisligil, 2003; Trayhun e Wood, 2004) (Figura 8). Dentre as adipocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo pode-se destacar: TNF- α , IL-6, resistina, RBP4, lipocalina 2, MCP-1, visfatina (Mathis e Shoelson, 2011) e mais recentemente caracterizada, a fractalquina (Shah R e col. 2011).

Figura 8 - As múltiplas funções do tecido adiposo



Legenda: O tecido adiposo sintetiza e secreta adipocinas, e também atua na captação, síntese e estoque de lipídios. Além de ser o maior reservatório energético do corpo, também é uma fonte de fatores pró-inflamatórios que modulam a resposta inflamatória podendo promover aterosclerose, disfunção vascular e resistência à insulina. As doenças inflamatórias ou imunes para as quais as principais

adipocinas contribuem através de sua ação ou omissão estão representadas nas caixas roxas. Já círculos em rosa representam a participação de outras adipocinas

Fonte: Adaptado de Lago e col., 2007.

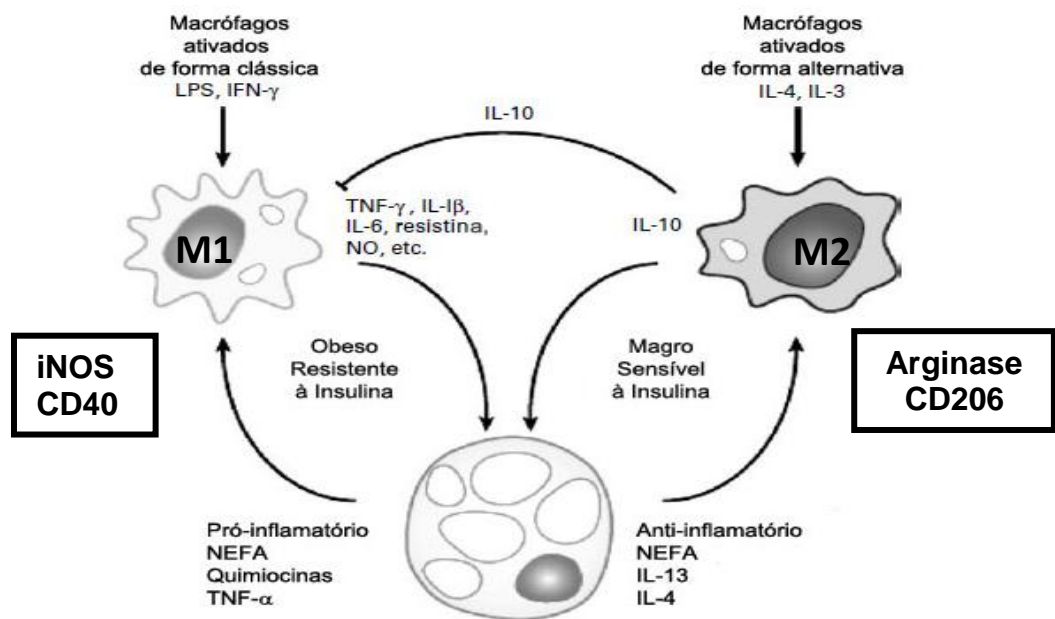
Atualmente a obesidade é caracterizada como sendo um estado de inflamação crônica, apresentando níveis circulantes elevados de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que são reconhecidamente importantes no desenvolvimento de complicações metabólicas, entre elas a resistência à insulina (Dandona e col., 2004, Dalmas e col., 2011). É consensual que na obesidade o tecido adiposo aumentado funciona como um sítio inflamatório e que, concomitante ao seu desenvolvimento, observa-se um aumento do número de macrófagos infiltrados e residentes no mesmo (Wellen e Hotamisligil, 2003). Por exemplo, já foi demonstrado que o conteúdo de macrófagos presentes no tecido adiposo de um camundongo magro corresponde a 10% do total de células, enquanto na obesidade extrema chega 50% do número total de células deste tecido (Weisberge col., 2003).

O acúmulo de macrófagos infiltrados no tecido adiposo está intimamente relacionado com o aumento do mesmo (Weisberg e col., 2003; Xu e col., 2003; Curat e col., 2004) e com o agravamento do quadro inflamatório instaurado na obesidade. Os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α e IL-6, que levam a diminuição da sinalização de insulina, através da sua capacidade de suprimir a fosforilação de substratos do receptor de insulina (RI) em resíduos de tirosina (Steinberg, 2007). Como consequência, ocorre um aumento da fosforilação do RI em resíduos de serina, devido à ativação de quinases como PKC, JNK e IKK- β (Steinberg, 2007). De maneira interessante, observou-se que a perda de peso diminui o número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de pacientes obesos, gerando uma melhora do quadro inflamatório. Essas células inflamatórias se apresentam tanto dispersas no tecido, como formando estruturas em forma de coroa (“crown like structures”) ao redor dos adipócitos (Clément e col., 2004, Canello e col., 2005). Os macrófagos são células capazes de induzir respostas celulares do tipo Th1, quando estimuladas por Interferon-gama (IFN γ) ou com lipopolissacarídeos (LPS), produzindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α). O conceito de ativação de macrófagos teciduais dependente do tipo de estímulo recebido do microambiente onde se encontram tem emergido a partir das observações nas quais macrófagos exercem propriedades funcionais peculiares e são polarizados em tipos celulares especializados quando expostos a diferentes tipos de citocinas e produtos microbianos (Gordon, 2003). De acordo com uma classificação largamente utilizada, refere-se a macrófagos ativados classicamente por IFN γ /LPS

(lipopolissacarídeo) como macrófagos do tipo “M1”, e macrófagos do tipo “M2” os que são ativados alternativamente por IL-4 e IL-13, sendo capazes de induzir respostas do tipo Th2 (Mantovani e col., 2002).

Quando polarizados para o fenótipo “M1”, os macrófagos são capazes de produzir quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- γ , IL-6, IL-12) e geram espécies reativas de oxigênio (ROS), como também óxido nítrico via ativação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Bronte e Zanovello, 2005). Nos macrófagos do tipo “M2” a produção de arginase está aumentada, o que leva ao bloqueio da atividade de iNOS através de diversos mecanismos, incluindo a competição pelo substrato (arginina), necessário para a produção de óxido nítrico (NO) (Bronte e Zanovello, 2005). Células “M2” apresentam baixa atividade microbicida (Takahashi e col., 2004) e mostram ser eficientes na função de reparação tecidual (Herbert e col., 2004; Noel e col., 2004). O repertório molecular dos macrófagos do tipo “M2” inclui, além da expressão- embora em baixos níveis- de algumas moléculas produzidas por macrófagos “M1”, como por exemplo a IL-1, a presença de IL-10 e do receptor de manose (Goerdts e col., 1999; Mantovani e col., 2002; McGreal e col., 2005) (Figura 9). Fica claro, portanto, que os macrófagos são células versáteis e capazes de serem polarizadas em um fenótipo pró (M1) ou anti-inflamatório (M2), dependendo do microambiente à sua volta e, aparentemente também, da subpopulação de monócitos circulantes que os originou (Dalmas e col., 2011).

Figura 9 - Representação esquemática dos fatores que regulam a polarização de macrófagos e resistência à insulina no tecido adiposo



Legenda: Em condições de magreza, os adipócitos secretam fatores como IL-13, o qual promove a ativação alternativa de macrófagos. Macrófagos ativados alternativamente (M2) secretam mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, e secretam fatores insulina-sensibilizantes. A obesidade induz modificações no metabolismo e expressão gênica dos adipócitos, resultando em um aumento da lipólise e na liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFA) pró-inflamatórios e fatores que recrutam e ativam macrófagos, como quimiocinas e TNF α . Macrófagos M1 ativados produzem grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, como TNF α , IL-1 β e resistina, que agem nos adipócitos e induzem um estado insulino-resistente. Então se estabelece uma alça de retroalimentação positiva que promove amplificação da inflamação e da resistência à insulina. Macrófagos M1 são caracterizados pela expressão de iNOS e CD40, enquanto macrófagos M2 são reconhecidos pela expressão de arginase e CD206

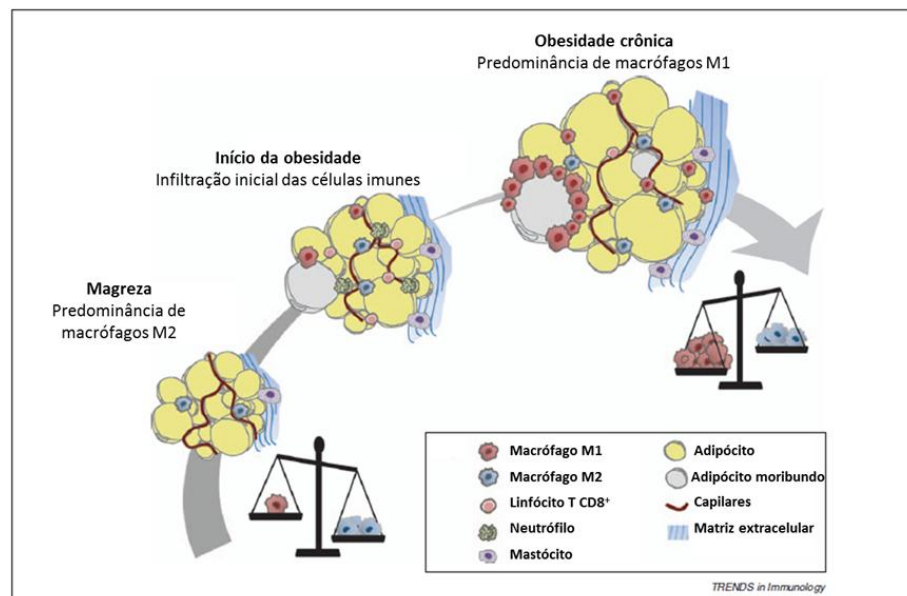
Fonte: Olefsky e Glass, 2010.

Embora diversos estudos clínicos e experimentais tenham caracterizado o tecido adiposo como o foco inflamatório na obesidade, pouco se sabe sobre os elementos que iniciam a inflamação. Uma possibilidade é que as citocinas, quimiocinas e adipocinas, (dentre elas leptina e adiponectina) produzidas pelos adipócitos atuem nesse processo. Uma marca registrada da obesidade é a hipertrofia dos adipócitos, que assumem um perfil de secreção pró-inflamatório. Eventualmente essa hipertrofia pode levar à morte dos adipócitos com consequente liberação do conteúdo intracelular para o espaço extracelular. Tal ocorrido parece gerar uma resposta inflamatória nas células vizinhas, em particular os macrófagos, induzindo-os a formar estruturas em forma de coroa (“crown like structures”) ao redor dos adipócitos que estão morrendo (Cancello e col., 2005).

Uma possível hipótese para o início da infiltração de macrófagos no tecido adiposo seria a hipertrofia dos adipócitos, que favorece o fluxo de ácidos graxos, um aumento da vascularização, aumento da secreção de leptina, hipóxia e morte dos adipócitos, o que não é tão pronunciado em condições de hiperplasia (Surny e Hasty, 2008) (Figura10).

Evidências mostram que a obesidade induz uma modificação fenotípica dos macrófagos presentes no tecido adiposo, que passam de um fenótipo anti-inflamatório M2, característico do tecido adiposo magro, para um perfil pró-inflamatório M1, encontrado no tecido adiposo obeso (Lumeng. e col., 2007) (Figura 9). Contudo, ainda não está claro se este aumento na quantidade de macrófagos M1 se dá à custa do aumento da infiltração de macrófagos M1 ou se decorre de uma repolarização dos macrófagos M2.

Figura 10 - Alterações celulares no tecido adiposo durante a obesidade

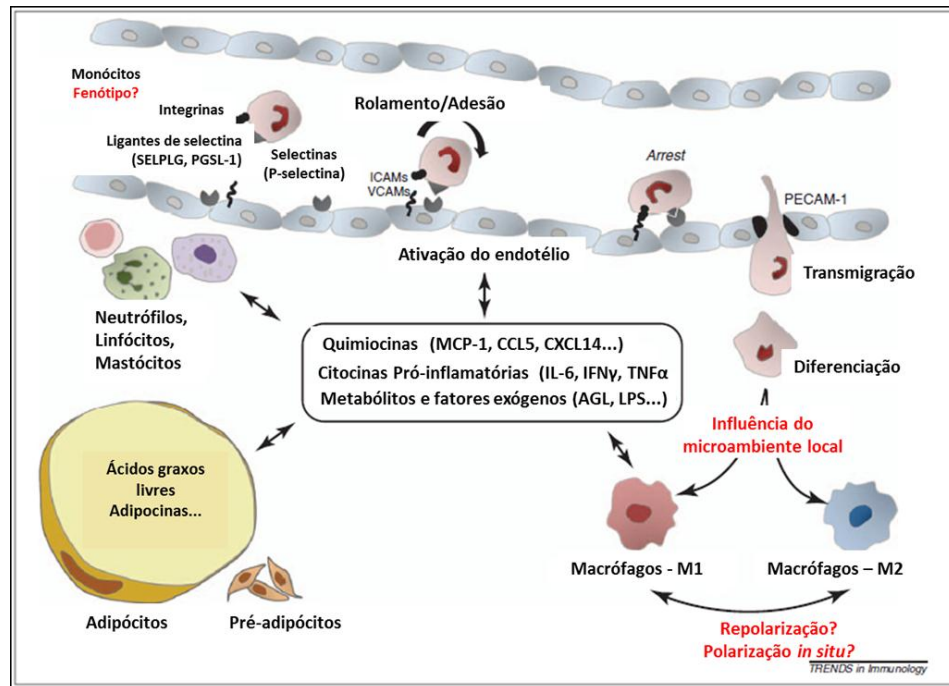


Legenda: O tecido adiposo de indivíduos eutróficos saudáveis contém macrófagos do tipo M2 residentes que ajudam na manutenção da homeostase tecidual. Com base em estudos cinéticos em camundongos obesos, acredita-se que diversas células do sistema imune, incluindo neutrófilos, linfócitos T CD8+ e mastócitos infiltram o tecido adiposo antes do recrutamento dos macrófagos do tipo M1. Sendo assim, os adipócitos hipertrofiados se tornam inflamatórios e/ou necróticos, desse modo induzindo a organização dos macrófagos M1 em estruturas em forma de coroa.

Fonte: Dalmas e col., 2011.

Diversos autores têm demonstrado que a maioria dos macrófagos encontrados no tecido adiposo deriva de monócitos circulantes (Figura 11). Weisberg e colaboradores (Weisberg e col. 2003) mostraram que, após transplante de células de medula óssea em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, a maioria dos macrófagos encontrados no tecido adiposo eram derivados dos monócitos circulantes. Posteriormente, o grupo de Lumeng (Lumeng e col. 2007) confirmou e reforçou estes resultados através da identificação e marcação fenotípica de monócitos. Tendo em vista estes dados, torna-se claro que o conhecimento das características e mecanismos das funções monocitárias são de crucial importância para o entendimento e manipulação da infiltração de macrófagos no tecido adiposo.

Figura 11 - Recrutamento de monócitos para o tecido adiposo



Legenda: Em condições de obesidade, macrófagos do tecido adiposo juntamente com adipócitos hipertrofiados, pré-adipócitos e outras células imunes produzem um painel de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e metabólitos que participam da ativação do endotélio. Tal ativação leva as células do endotélio a produzirem diversas moléculas de adesão, incluindo selectinas, ICAMs, moléculas de adesão a células vasculares e PECAM-1. Através de processos de rolamento/adesão, os monócitos diminuem sua velocidade e eventualmente se ligam às proteínas de adesão ao endotélio através de ligantes de selectina e integrinas. Subsequentemente, os monócitos sofrem um espalhamento actina-dependente, polarização e migração para a superfície luminal do endotélio integrina-dependente. Então as células sofrem diapedese. No tecido adiposo os monócitos sofrem ativação em macrófagos M1 ou M2 de acordo com seu fenótipo circulante inicial e/ou em resposta aos estímulos do microambiente.

Fonte: Dalmas e col., 2011.

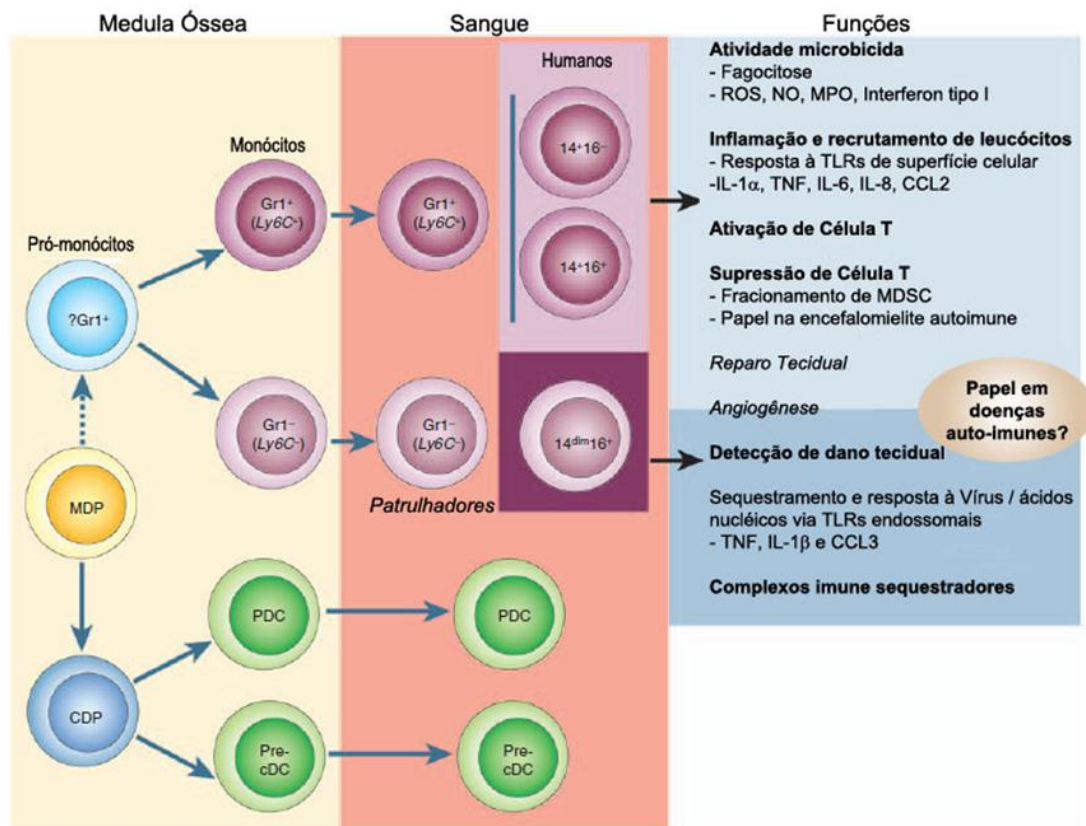
Monócitos

Os monócitos são leucócitos circulantes que se originam na medula óssea, a partir do precursor comum de monócitos, macrófagos e células dendríticas (MDP) e dão origem aos macrófagos e células dendríticas (Geissmann e col., 2010) (Figura 12). Em humanos os monócitos representam 5-10% dos leucócitos circulantes, já em camundongos representam 4% do total de leucócitos, sendo sua meia-vida na circulação de aproximadamente três dias (Pandzić Jaksić e col., 2010). Os mesmos possuem uma função importante no desenvolvimento e na homeostase, em parte pela remoção de células apoptóticas e componentes tóxicos (Williams, 2007; Franc e col., 1996). Além disso, são considerados o

alicerce do sistema imune, pois fazem a conexão entre o sistema imune inato e adaptativo, além de atuarem de forma crítica em diversas doenças inflamatórias (Hume, 2006; Ziegler-Heitbrock, 2000).

Entretanto uma das funções mais importantes dos monócitos reside no fato de os mesmos serem células efectoras do sistema imune capazes de migrar da corrente sanguínea para os tecidos, dando origem a macrófagos e células dendríticas (Serbina e Pamer, 2006; Randolph e col., 1999; Geissmann e col., 2003; Varol e col., 2007). Além disso, os monócitos também representam um grande reservatório de células sequestradoras e efectoras capazes de atuar na homeostase de vasos e nos processos inflamatórios (Auffray e col., 2007). Nesse contexto os receptores sequestradores são capazes de reconhecer micro-organismos, lipídeos e células em processos de morte e, quando estimulados, são capazes de gerar grandes quantidades de moléculas efectoras envolvidas na defesa contra patógenos (Serbina e col., 2008; Strauss-Ayali e col., 2007; Geissmann e col., 2008) e na patogênese de diversas doenças inflamatórias, como por exemplo, artrite e aterosclerose (Libby e col., 2008). Sendo assim, estímulos inflamatórios, metabólicos e imunes são capazes de promover o recrutamento de monócitos nos tecidos periféricos, onde eles se diferenciam em macrófagos e células dendríticas, embora alguns macrófagos se originem a partir da multiplicação local

Figura 12 - Funções efetoras dos monócitos



Legenda: Células tronco hematopoiéticas produzem o precursor comum de monócitos, macrófagos e células dendríticas (MDP) na medula óssea. MDPs dão origem a monócitos, possivelmente através do pré-monócito GR1+ (linha tracejada), células dendríticas pré-clássicas (Pré-cDC) e células dendríticas plasmocitoides (PDC) via uma célula precursora dendrítica comum (CDP). Em camundongos, duas subpopulações de monócitos GR1+ (Ly6C+) e GR1- (Ly6C-) saem da medula óssea para ganhar a circulação. Os monócitos humanos correspondentes são mostrados em caixas roxas (clara e escura). As funções específicas conhecidas das subpopulações são mostradas em negrito nas caixas azuis (claro e escuro) (Adaptado de Saha e Geissmann, 2011).

Fonte: Saha e Geissmann, 2011.

Durante muito tempo, os monócitos foram considerados como uma população homogênea de células, porém sua heterogeneidade é hoje bem descrita. O termo monócito deve ser entendido como aquele que descreve células que compartilham uma aparência similar global, porém com funções distintas (Muller, 2001). As primeiras caracterizações de monócitos se baseavam em suas características morfológicas, entretanto o advento da utilização de anticorpos monoclonais e da citometria de fluxo permitiram sua caracterização a partir da expressão de receptores de superfície (Heimbeck e col., 2010). Monócitos

compartilham características típicas como formato irregular, núcleo em formato oval, vesículas citoplasmáticas e uma elevada razão citoplasma núcleo. No entanto, apresentam forma e tamanho extremamente heterogêneo o que dificulta sua distinção de células dendríticas, linfócitos ativados e células natural killer, com base em parâmetros morfológicos e de análise de dispersão de luz (Auffray e col., 2009).

O estudo dos monócitos humanos não se constitui em uma tarefa fácil, uma vez que os mesmos atuam vigiando permanentemente seu ambiente e reagem rapidamente às suas modificações ou alterações. Técnicas de isolamento e purificação em gradientes contínuos, bem como a cultura celular podem afetar seu fenótipo e comportamento (Auffray e col., 2009). Durante os últimos anos diversos grupos de pesquisa desenvolveram estratégias para o estudo, *in vivo*, da diferenciação e do recrutamento de monócitos. Entretanto, mediante as claras dificuldades metodológicas encontradas que restringem tais estudos em humanos, os modelos murinos têm permitido o avanço no conhecimento através da utilização de técnicas de transferência adotiva e análises intravitalis (Auffray e col., 2007; Sasmono e col., 2003).

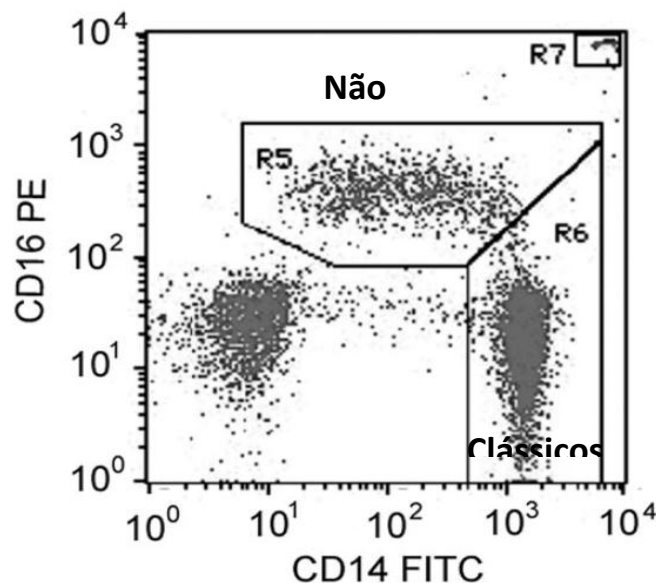
Os diferentes fenótipos e a heterogeneidade funcional de monócitos humanos foram descritos pela primeira vez no começo da década de 1980 por diversos grupos independentes. Tais diferenças se caracterizavam por variações morfológicas, como por exemplo, variação de tamanho, granulosidade e da morfologia nuclear (revisado por Saha e Geissmann, 2011). Nestes estudos, duas subpopulações de monócitos foram identificadas baseando-se em diferenças de tamanho e densidade. Distinguiram-se uma população principal e regular de monócitos com tamanho maior, que apresentava elevada atividade fagocítica, além da liberação aumentada de superóxido; e uma população minoritária de monócitos intermediários de menor tamanho, com baixa atividade fagocítica, porém com uma capacidade aumentada de produção e liberação de IL-1 e de mediar a citotoxicidade dependente de anticorpo (Auffray e col., 2009).

Estudos mais recentes permitiram a identificação da expressão diferencial de marcadores antigênicos em células de uma mesma subpopulação, ratificando o conceito de heterogeneidade e fornecendo os primeiros indícios das diferentes atividades fisiológicas exercidas pelos diferentes subtipos de monócitos (Revisto por Ziegler-Heitbrock e col., 2010). Sendo assim, de maneira bem inicial, os monócitos foram identificados pelos altos níveis de expressão do receptor CD14, o os classificou, erroneamente, como um grupo celular único e homogêneo, os chamados monócitos convencionais (Ziegler-Heitbrock, 1996). Posteriormente, descobriu-se que os monócitos de tamanho menor poderiam ser identificados

também pela expressão do receptor CD16 (receptor de baixa afinidade para a região Fc de IgG (FC γ RIII) (Passlick e col., 1989; Kawanaka e col. 2002).

A partir de tais achados foi proposto que a expressão de CD16 poderia distinguir dois subtipos principais de monócitos, caracterizando-os como monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ (clássicos) e CD14⁺CD16⁺⁺ (não clássicos) (Passlick e col., 1989; Saha e Geissmann, 2011) (Figura 14). Tal visão dicotomizada da heterogeneidade de monócitos prevaleceu por duas décadas (Zawada e col., 2011). Entretanto, posteriormente foi demonstrado que os monócitos CD16 (não clássicos) compreendiam mais de uma subpopulação com funções notavelmente distintas (Grage-Griebenow e col., 2001) (Figura 15). A partir desta descoberta, a maior parte dos estudos sobre a heterogeneidade de monócitos se baseia, prioritariamente, nos estudos desenvolvidos com os monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ (Wong e col., 2011).

Figura 13 - Análise das duas subpopulações de monócitos inicialmente caracterizadas



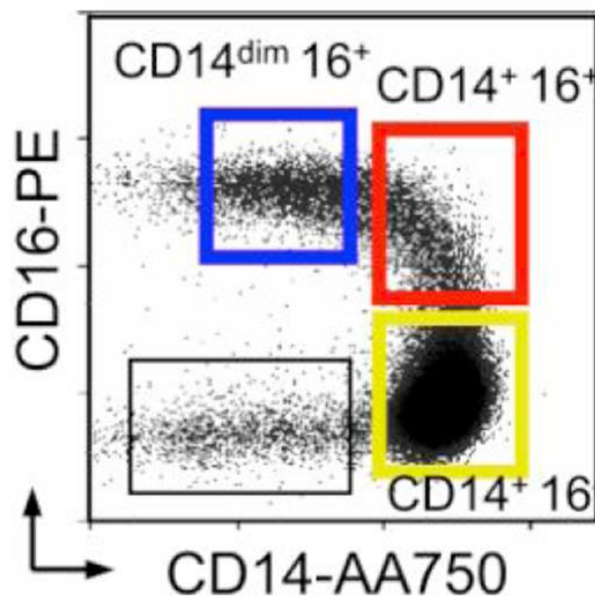
Legenda. Exemplo de marcação para a identificação dos dois subtipos de monócitos através da utilização de anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 em uma amostra de sangue oriunda de um voluntário sadio (Ziegler-Heitbrock, 2007).

Fonte: Ziegler-Heitbrock, 2007.

Contudo, alguns autores demonstraram que os monócitos CD16, outrora chamados de não clássicos, podem ser subdivididos em monócitos CD14⁺CD16⁺ com alta atividade fagocítica e produção de TNF α e IL-1, em resposta ao LPS (Grage-Griebenow e col., 2001); e em monócitos CD14^{dim}CD16⁺ que apresentam níveis extremamente baixos de CD14, têm baixíssima atividade fagocítica e não produzem TNF α e IL-1 em resposta ao LPS (Skrzeczynska-Moncznik e col., 2008, Cros e col, 2010) (Figura 15).

Assim, a partir da revisão mais atual de sua nomenclatura atualmente os monócitos são divididos em três subpopulações: monócitos clássicos, que apresentam elevada expressão de CD14 e ausência de CD16 ($CD14^+CD16^-$ ou $CD14^{++}CD16^-$), monócitos intermediários, que apresentam elevada expressão de CD14 e baixa expressão de CD16 ($CD14^+CD16^+$ ou $CD14^{++}CD16^+$) e finalmente os monócitos não clássicos, que apresentam expressão elevada de CD16 e baixa expressão de CD14 ($CD14^{dim}CD16^+$ ou $CD14^+CD16^{++}$) (Ziegler-Heitbrock e col., 2010; Cros e col., 2010; Poitou e col., 2011; Wong e col., 2011).

Figura 14 - Análise das duas subpopulações de monócitos inicialmente caracterizadas



Legenda: Exemplo de marcação para a identificação dos dois subtipos de monócitos através da utilização de anticorpos anti-CD14 e anti-CD16 em uma amostra de sangue oriunda de um voluntário sadio.

Fonte: Cros e col., 2010.

Os monócitos $CD14^+CD16^-$ representam, aproximadamente, 90% dos monócitos circulantes. São caracterizados pela alta expressão de CCR2 e baixos níveis de CX3CR1, além de produzirem IL-10, ao invés de TNF α e IL-1 em resposta ao LPS, *in vitro*. Estas células se assemelham aos monócitos murinos “inflamatórios” GR1 $^+$, pois compartilham a expressão de marcadores de superfície, bem como de vários genes. Além disso, ambos são responsáveis pela fagocitose e produção de ROS (Auffray e col., 2009; Cros e col., 2010).

Os monócitos intermediários ($CD14^+CD16^+$) correspondem a 5% dos monócitos circulantes e são globalmente caracterizados pela expressão de CX3CR1, HLA-DR e CCR5, MHC de classe II, além da expressão de genes envolvidos no processamento de antígenos e na reciclagem de proteínas. É proposto que a subpopulação de monócitos em questão esteja em um estágio de diferenciação intermediário entre os monócitos clássicos e não clássicos, constituindo uma subpopulação transicional, o que pode ser ratificado pela expressão de diversos genes e marcadores de superfície em níveis intermediários (Wong e col., 2011). Estes tipos celulares são comparáveis aos monócitos murinos $Gr1^+$, por serem responsáveis pela maior parte da produção de ROS, IL-8, IL-6 e TNF α em resposta ao LPS (Cros e col., 2010).

Já os monócitos não clássicos ($CD14^{dim}CD16^+$) correspondem a aproximadamente 5-7% dos monócitos circulantes, caracterizam-se por não apresentarem CCR2 e expressarem níveis baixos de CCR5. Representam uma subpopulação de monócitos capaz de patrulhar os vasos sanguíneos, detectar seletivamente células infectadas por vírus e células danificadas, produzindo citocinas pró-inflamatórias e podem responder de maneira eficaz a vírus e ácidos nucléicos via TLR7 e TLR8 (Cros e col., 2010). Além disso, expressam uma grande quantidade de genes envolvidos no rearranjo do citoesqueleto (Wong e col., 2011).

A comparação direta entre as subpopulações de monócitos humanos e murinos é dificultada, em parte, pelas diferentes metodologias experimentais utilizadas em ambas as espécies. Entretanto, acredita-se que tanto os monócitos $CD14^+CD16^-$ como os monócitos $CD14^+CD16^+$ se assemelhem aos monócitos murinos $Gr1^+$ (Auffray e col., 2009; Cros e col., 2010). Contudo, em trabalho recente foi sugerido que os monócitos $CD14^+CD16^-$ seriam homólogos aos $Gr1^+$, enquanto os monócitos $CD14^+CD16^+$ seriam homólogos aos monócitos $Gr1^-$ (Ingersoll e col., 2010). Nesse contexto, é de extrema importância ressaltar que é provável que a maioria das divergências literárias sobre o assunto em questão é o resultado de metodologias diferentes empregadas nos artigos científicos, bem como na utilização de monócitos $CD14^+16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$ como uma única população homogênea (Cros e col., 2010; Wong e col., 2011). Já os monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ parecem se assemelhar à subpopulação murina $Gr1^-$ (Cros e col., 2010).

Apesar de não estarem muito bem caracterizados em humanos, os monócitos $CD16^+$, ($CD14^{dim}CD16^+$ e $CD14^+CD16^+$) têm sido diretamente relacionados a doenças inflamatórias, tais como inflamação aguda (Mizuno e col., 2005), doenças inflamatórias, sepse, HIV (Geissmann e col., 2003), asma severa (Moniuszko e col., 2009), artrite reumatóide e aterosclerose (Ziegler-Heitbrock, 2007). Além disso, estudos recentes mostraram um aumento

na frequência de monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ e $CD14^+CD16^+$ na obesidade (Poitou e col., 2011).

Com base no conteúdo aqui exposto e tendo em vista a que a situação de inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade é sustentada, basicamente, pelo aumento da infiltração dos macrófagos no tecido adiposo, torna-se necessário esclarecer quais seriam as alterações fenotípicas nos monócitos de indivíduos obesos que poderiam contribuir para o aumento do número de macrófagos no tecido adiposo. Assim, seria interessante avaliar se as diferentes populações de monócitos circulantes de indivíduos obesos apresentariam alterações na expressão gênica de marcadores e moléculas relacionadas à inflamação.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Analisar a frequência das subpopulações de monócitos sanguíneos em indivíduos adultos eutróficos, obesos, obesos diabéticos e obesos após a cirurgia bariátrica. Além de caracterizar fenotipicamente essas subpopulações quanto à expressão de diversos genes nos monócitos dos indivíduos adultos.

1.2. Objetivos específicos

1.2.1 Caracterizar por citometria de fluxo, a frequência dos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ com base na expressão dos receptores CD14 e CD16

1.2.2 Verificar a expressão gênica de diversos genes relacionados a processos migratórios, de adesão e inflamação através da técnica de microarranjo a partir das seguintes comparações

- a) Comparar as expressões de cada gene entre as três subpopulações de monócitos, tanto em indivíduos eutróficos como em indivíduos obesos.
- b) Comparar individualmente para cada subpopulação de monócitos, as expressões de cada gene entre os indivíduos eutróficos e obesos e entre os indivíduos obesos e obesos após a cirurgia bariátrica.

1.2.3 Verificar o efeito do meio condicionado do tecido adiposo visceral, obtido de paciente que foram submetidos à cirurgia bariátrica, sobre monócitos CD14⁺CD16⁻

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Os pacientes que compuseram este estudo faziam parte do programa de cirurgia gástrica e foram recrutados entre 2009-2010 no Departamento de Nutrição do Hospital Pitié-Salpêtrière (centro de referência para o cuidado médico e cirúrgico da obesidade, Paris, França). Todas as investigações clínicas e científicas foram aprovadas pelo comitê de ética do hospital Hôtel-Dieu (Projeto colaborativo ADAPT, número de contrato: HEALTH-F2-2008-201100). Todos os indivíduos manifestaram seu consentimento por escrito. O estudo foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki além de ter sido registrado no registro de julgamentos públicos. Todos os procedimentos foram registrados em conformidade com as leis federais e institucionais francesas.

Quatro grupos de pacientes foram incluídos no presente estudo. O primeiro grupo, o grupo obeso foi composto por 7 indivíduos obesos [OB], o segundo grupo, o grupo obesos/diabéticos, foi composto por 6 indivíduos obesos que também apresentavam diabetes do tipo 2 [OB/D]. O terceiro grupo de pacientes foi formado por 6 indivíduos obesos do grupo OB que se submeteram à cirurgia bariátrica para perda de peso. Os pacientes que foram submetidos à cirurgia bariátrica deveriam se enquadrar nos seguintes critérios: índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 40 kg/m² ou pacientes com IMC de 35 kg/m² e no mínimo uma co-morbidade associada (hipertensão, diabetes tipo 2, dislipidemia ou síndrome da apneia obstrutiva do sono). As avaliações pré-operatórias consistiam de um histórico médico e físico detalhado, além de avaliações nutricionais, metabólicas, cardiopulmonares, vasculares e psicológicas. Outro critério a ser seguido pelos pacientes foi a estabilidade do peso (variação de menos de ± 2 kg) por no mínimo três meses antes da cirurgia. Além disso, os pacientes não poderiam apresentar evidências de doenças inflamatórias crônicas, doenças infecciosas, câncer ou consumo de álcool (>20 por dia). Os critérios de classificação para diabetes do tipo 2 incluíam glicemia de jejum acima de 7mmol/L ou o uso de uma droga antidiabética. Os 6 pacientes [grupo OB/D] foram tratados com metformina ou drogas hipolipêmicas (fibratos ou “stains”). Antes da realização do *by-pass* gástrico em Y de Roux (RYGB), foi realizado um teste oral de tolerância à glicose para confirmar a normoglicemia dos pacientes do grupo OB. Estes deveriam apresentar níveis de glicose menores que

11mmol/L (200 mg/dL) duas horas após o desafio oral com 75 g de glicose. Os dados clínicos e biológicos foram obtidos antes da cirurgia bariátrica (RYGB) para os grupos [OB], [OB/D] e três meses após a cirurgia somente para o grupo [OB]. O quarto grupo consistia no grupo controle [C] que foi formado por 7 voluntários saudáveis, eutróficos e não diabéticos que viviam em proximidade aos indivíduos obesos.

2.2 Isolamento das células mononucleares e posterior enriquecimento em monócitos

Amostras de sangue venoso foram coletadas em jejum (10-20 mL/indivíduos adultos e 5 mL/crianças), na presença de EDTA, por sistema a vácuo (Vacutainers BD) com o objetivo de diminuir a ativação espontânea de células sanguíneas durante a coleta bem como de impedir a coagulação sanguínea. Em seguida as amostras de sangue foram avolumadas para 30 ml com o tampão para citometria (tampão salina-fosfato contendo 2% de soro fetal bovino e EDTA 5mM) sendo posteriormente depositadas sobre 15 mL do gradiente de Ficoll/Hystopaque (PAA Laboratory, GE Healthcare). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 770.g, à temperatura ambiente. Após a centrifugação as frações de PBMC foram coletadas e, para seu enriquecimento em monócitos, submetidas a um gradiente hiperosmótico de Percoll (48,5% de Percoll, 41,5% de H₂O e 10% de NaCl 1,6 M) (GE Healthcare) seguido de uma centrifugação por 15 minutos a 580.g em temperatura ambiente, conforme anteriormente descrito (Repnik e col., 2003). Em seguida as células foram contadas por exclusão, com azul de Trypan, em câmaras de Malassez ou Neubauer.

2.3 Citometria de Fluxo

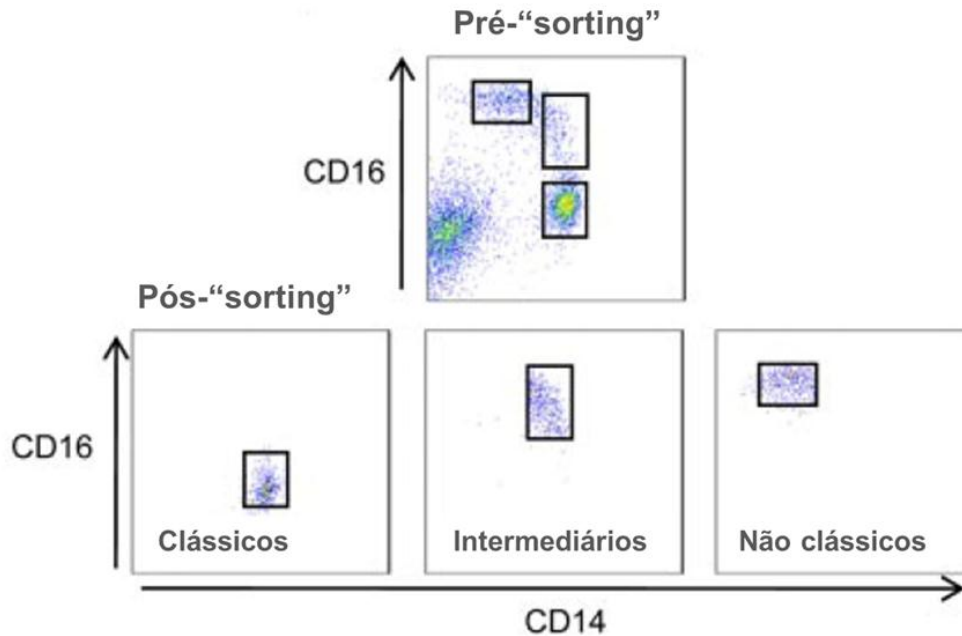
As suspensões celulares obtidas a partir do sangue de crianças e separados através dos gradientes de Ficoll e Percoll foram incubadas com anticorpo anti- CD14 conjugado à alofococianina (APC) e com o anticorpo anti-CD16 conjugado à fluoresceína isotiocianato (PE) por 20 minutos a 4°C no escuro. Posteriormente as células foram lavadas com tampão de FACS e analisadas em um citômetro Accuri C6. Primeiramente a população de monócitos foi definida de acordo com suas características de tamanho e granulosidade e posteriormente

definidas como células positivas para CD14. As subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ foram distinguidas de acordo com o seu padrão de expressão do receptor de LPS (CD14) e do receptor Fcγ-III (CD16). Os dados de citometria de fluxo foram analisados através de BD CFlow® software.

2.4 Seleção (sorting) das subpopulações de monócitos

As suspensões celulares obtidas a partir do sangue de adultos foram analisadas através de citometria de 3 cores e os monócitos foram primeiramente identificados através de suas características de tamanho e granulidade, sendo subsequentemente definidos como as células positivas para CD14. As subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ foram distinguidas de acordo com o seu padrão de expressão do receptor de LPS (CD14) e do receptor Fcγ-III (CD16). As suspensões celulares enriquecidas em monócitos foram incubadas com anticorpo anti- CD14 conjugado à alofocianina (APC) e com o anticorpo anti-CD16 conjugado à fluoresceína isotiocianato (PE) por 20 minutos a 4°C no escuro. Imediatamente antes da seleção e separação das células, as mesmas foram filtradas através em pequenos filtros (CellTrics) de 30 µm (Partec, Görlitz, Germany). Em seguida os grumos celulares (dublets) foram excluídos utilizando –se FSC –W versus FSC-H and SSC-W versus SSC-H. Os três subtipos de monócitos (CD14^{dim}CD16⁺, CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻) foram separados utilizando-se o mecanismo de separação celular ativada por fluorescência (FACS Vantage cell sorter, BD Biosciences) (Figura 16). As subpopulações de monócitos foram separadas diretamente em tampão RLT (Qiagen) para obtenção de RNA e estocadas em freezer -80°C até o isolamento do RNA. A pureza e eficiência das separações foram checadas por citometria de fluxo e estavam entre 95-99,9%. Os dados de citometria de fluxo foram analisados utilizando-se o software FlowJo versão 7.9 (Treestar, Ashland, OR).

Figura 15 - Estratégia de purificação das subpopulações de monócitos humanos por FACS “Cell sorting”



Legenda: No esquema as três subpopulações de monócitos são representadas antes e após a purificação. Monócitos Clássicos (CD14⁺CD16⁻), monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) e monócitos não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺).

Fonte: Adaptado de Wong e col., 2011.

2.5 Extração de RNA

O RNA total foi isolado a partir das células selecionadas (separadas) utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). As células foram lisadas em tampão RLT mais β-mercaptoetanol 1%. Após a lise o homogenato foi misturado a um volume de etanol 70%. Em seguida o homogenato foi aplicado sobre a coluna de extração de RNA e centrifugado por 1 minuto a 8000 g a 4 °C. Posteriormente foram adicionados à coluna os tampões RW1 e RPE, seguidos de duas centrifugações de um minuto cada a 8000 g à 4°C. Finalmente, adicionou-se água à coluna para diluição do RNA. Para evitar a contaminação com DNA genômico as amostras foram tratadas com DNase I. Em seguida as amostras de RNA foram estocadas em freezer -80°C para posteriores análises.

2.6 Quantificação de RNA

A qualidade e a quantidade das amostras de RNA foram analisadas em PicoChips (Total Eukaryotic RNA Essay Pico II Kit, Qiagen) através de eletroforese capilar (BioAnalyzer, Agilent, Santa Clara, USA). Resumidamente, as amostras de RNA foram desnaturadas por 2 minutos à 70°C. Em seguida as amostras de RNA foram inseridas em micro chips previamente preenchidos com gel misturado a um corante para detecção dos picos de RNA presentes nas amostras e no padrão. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em um bionalisador o qual fornece informações sobre a amostra, bem como o número de integridade do RNA (RIN) bem como sua concentração. As análises dos dados foram feitas a partir do Software 2100 Expert Software. Amostras com o número de integridade do RNA (RIN) ≥ 7 foram consideradas apropriadas para o qPCR.

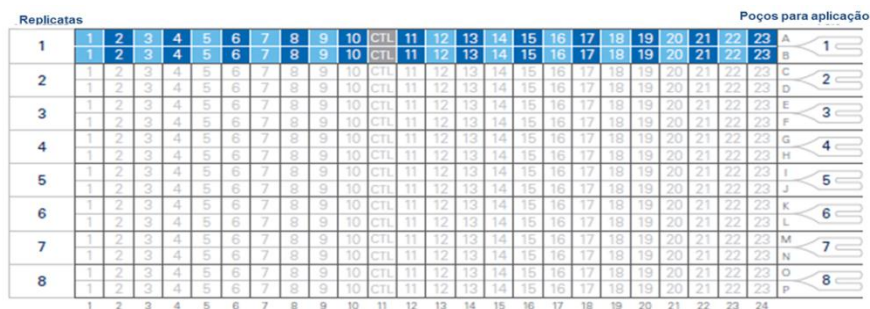
2.7 Transcrição reversa e amplificação do DNA complementar

O RNA foi retro-transcrito em DNA complementar utilizando-se o kit RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) para quantidades muito pequenas de RNA (1pg – 1µg de RNA). Resumidamente, as amostras de RNA foram misturadas ao tampão Master Mix 5 vezes concentrado (fornecido pelo fabricante) e à água livre de nucleases. Em seguida, as amostras foram submetidas a um ciclo de 25°C (5 minutos), 42°C (30 minutos) e 85°C (5 minutos). Após a formação da fita simples de DNA as amostras de DNA foram amplificadas 10000 vezes através da utilização do kit TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). A seguir, 720 picogramas de DNA complementar por amostra foram misturadas a um pool de primers dos genes de interesse que deveriam ser amplificados (ensaios de expressão gênica TaqMan) e ao Master Mix de pré-amplificação TaqMan. Posteriormente as amostras foram submetidas a 14 ciclos de 95° C (15 segundos) e 60°C (4 minutos). As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer -80°C até o momento de uso.

2.8 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

As amostras de DNA complementar foram amplificadas através da utilização do ensaio de micro arranjo de baixa-densidade sistema, tecnologia TaqMan®(TaqMan Low Density Array-TLDA). As placas micro fluídicas utilizadas para as análises das expressões gênicas foram criadas especialmente para a detecção da expressão de genes de citocinas, quimiocinas, receptores de superfície, moléculas de adesão entre outras moléculas relacionadas ao processo inflamatório em monócitos. Resumidamente, placas micro fluídicas de 348 poços foram carregadas com diferentes ensaios de expressão gênica (primers) TaqMan. As placas foram divididas em 8 carreiras com 48 poços cada, onde estavam os 24 primers em duplicata (Figura 17). As amostras de DNA complementar (2 nanogramas por poço) foram aplicadas por carreira e posteriormente centrifugadas para uma distribuição homogênea nos poços. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no sistema 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). O sistema de micro-arranjo de baixa densidade foi utilizado para a análise da expressão de 22 genes essenciais e dois genes constitutivos (actina e GAPDH) e são listados em seguida: CCR2 (Hs00356601_m1), CCR5 (Hs00152917_m1), CX3CR1 (Hs00365842_m1), CSF1R (Hs00911250_m1), TNF (Hs99999043_m1), IL6 (Hs00985639_m1), IL8 (Hs00174103_m1), IL1B (Hs01555410_m1), IL10 (Hs00961622_m1), ACTB (Hs99999903_m1),CCL2 (Hs00234140_m1), CCL3 (Hs00234142_m1), NOS2 (Hs01075529_m1),TLR2 (Hs00152932_m1), TLR4 (Hs00152939_m1), TLR7 (Hs00152971_m1), TLR8 (Hs00607866_mH), PPARG (Hs01115513_m1), ICAM1 (Hs00164932_m1), VCAM1 (Hs01003372_m1), CD36 (Hs00169627_m1), MMP9 (Hs00234579_m1), SELPLG (Hs00380945_m1). Todos os ensaios foram pré-desenvolvidos e validados pela Applied Biosystems.

Figura 16 - Esquema da placa microfluídica de “microarray” TLDA, Applied Biosystems



Para as apresentações dos dados de expressão gênica utilizamos dois tipos de comparações. Primeiramente, comparamos as três subpopulações de monócitos de acordo com a expressão dos diversos genes no grupo C e no grupo OB, utilizando como referência a subpopulação de monócitos CD14⁺CD16⁻ de cada grupo. Ou seja, calculamos os $\Delta\Delta Ct$ s a partir da seguinte fórmula representada na letra A:

Figura 17 - Estratégias para obtenção dos valores de $\Delta\Delta Ct$ a partir da utilização de genes de referência

A

Ct relativo = Ct do gene de interesse – média do Ct do gene de interesse da subpopulação CD14⁺CD16⁻

$\Delta Ct = Ct$ relativo do gene de interesse – Ct do gene endógeno da amostra

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$$

Para as comparações entre os grupos C e OB e OB/AC utilizamos o grupo C como grupo de referência, e para tanto calculamos os $\Delta\Delta Ct$ s a partir do seguinte cálculo representado em B:

B

Ct relativo = Ct do gene alvo da amostra – média do Ct do gene de interesse do grupo controle

$\Delta Ct = Ct$ relativo do gene de interesse – Ct do gene endógeno da amostra

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$$

Legenda: (A) cálculos utilizados para as comparações entre as três subpopulações, (B) cálculos utilizados para as comparações entre os grupos C, OB e OB/AC.

2.9 Cultura de explantes de tecido adiposo visceral

Amostras de tecido adiposo visceral foram obtidas durante o procedimento de by-pass gástrico em Y de Roux (RYGB) e imediatamente lavadas em tampão salina fosfato acrescido de cálcio e magnésio. Em seguida pedaços de tecido adiposo foram cultivados em meio ECBM (Promocell, Heidelberg, Germany) acrescido de albumina bovina livre de ácidos graxos 1% e de penicilina e estreptomicina 1% de 18 a 24 horas à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Em seguida o sobrenadante do tecido adiposo foi coletado, centrifugado por 1 minuto à

13.000 g e filtrado em filtros de nylon de 0,22 μm , à 4°C. As alíquotas de sobrenadante de tecido adiposo foram posteriormente armazenadas em freezer -80°C.

2.10 Tratamento de monócitos com o meio condicionado do tecido adiposo visceral

Monócitos obtidos a partir do sangue de indivíduos obesos foram posteriormente selecionados (“sorting”) de acordo com o seu padrão de expressão do receptor de LPS (CD14) e do receptor $\text{Fc}\gamma\text{-III}$ (CD16). Em seguida, células CD14 positivas e CD16 negativas foram coletadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal de bezerro. Os monócitos (1×10^4 células) foram plaqueados em placas de 24 poços e deixados por duas horas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal de bezerro para aderência das células. Em seguida as células foram estimuladas com meio RPMI 10% de soro fetal de cabra ou meio RPMI + 10% do sobrenadante do tecido adiposo visceral por 24 horas. Após a incubação as células foram lavadas com tampão de FACS (tampão salina fosfato + soro fetal de bezerro 2% + EDTA 5 Mm) e removidas mecanicamente através da utilização de um rodo. Posteriormente as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD14 conjugados a APC e anti-CD16 conjugado a PE, além de DAPI, por 20 minutos a 4° C, no escuro. Finalmente, as suspensões celulares de monócitos foram analisadas de acordo com a presença ou não de CD14 e CD16 e células mortas DAPI positivas foram excluídas.

2.11 Análise Estatística

A distribuição normal dos dados foi analisada utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram transformados em log quando necessário. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste-t de Bonferroni e pelo teste t de student não pareado. Foi determinada como significância estatística $p < 0,05$ e $p < 0,1$ para as análises de expressão gênica em função do número amostral reduzido.

3 RESULTADOS

3.1 Características bioquímicas e laboratoriais e distribuição das subpopulações de monócitos dos indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos diabéticos para os quais houve caracterização de expressão gênica

A apresentação das características bioclínicas dos indivíduos eutróficos (grupo C IMC de 19,8 a 25,0 kg/m²), indivíduos obesos (grupo OB, IMC de 36,3 a 44,9 kg/m²) e indivíduos obesos diabéticos (grupo OB/D, IMC de 36,9 a 59,1 kg/m²) antes do RYGB e distribuição das subpopulações de monócitos. Os percentuais de CD14^{dim}CD16⁺ e CD14⁺CD16⁺ foram maiores nos grupos OB e OB/D quando comparado aos indivíduos eutróficos. E como era esperado o percentual de CD14⁺CD16⁻ diminuiu nos grupos OB e OB/D em comparação ao C.

Tabela 1 - Parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos adultos

	C	OB	OB/D
No.	6	7	6
Sexo (M/H)	4/2	5/2	6/0
Idade/anos	44,2 ± 12,6	43,4 ± 15,9	49,0 ± 6,4
BMI, Kg/m ²	21,3 ± 1,9	41,2 ± 3,0 ^A	49,1 ± 8,0 ^{A,B}
HbA1c, %	ND	5,7 ± 0,4	7,6 ± 0,9 ^B

Legenda: As três subpopulações de monócitos foram caracterizadas de acordo com os níveis de expressão de CD14 e CD16. Todos os valores são expressos como média ± desvio padrão. IMC indica o Índice de Massa corporal. M: mulheres; H: homens. O HbA1c(hemoglobina glicada) foi medido apenas nos grupos OB e OB/D. ^A OB e OB/D em relação a C, P<0,05; ^B OB/D em relação ao OB, P<0,05.

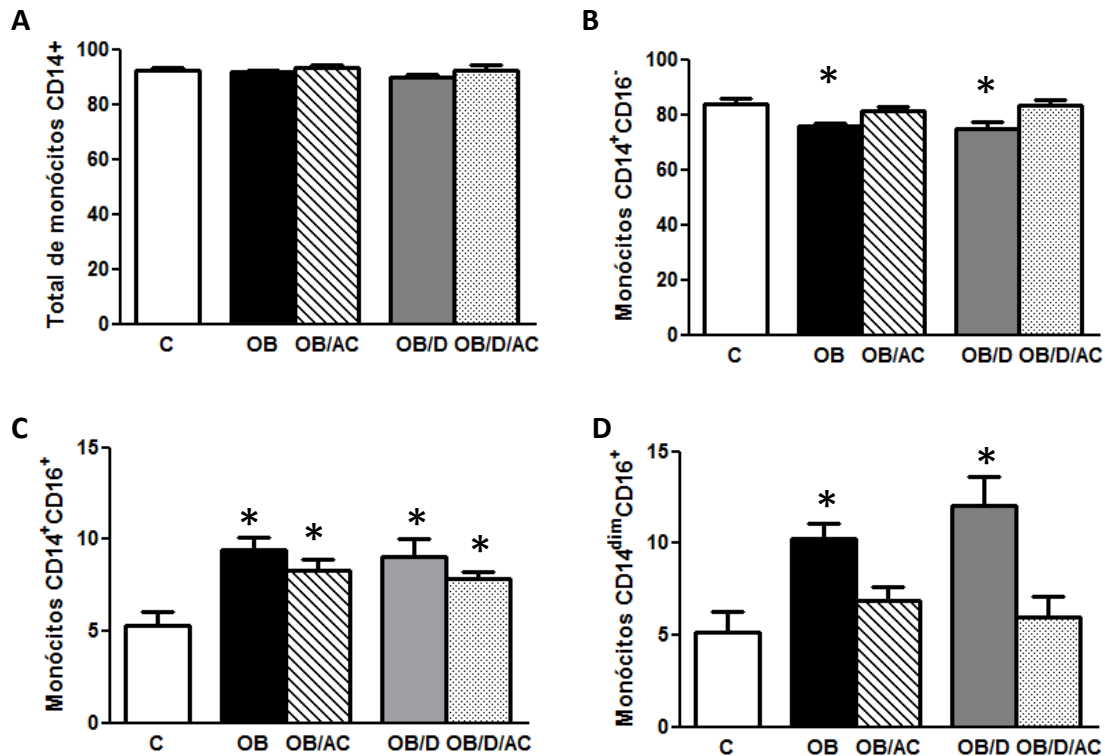
3.2 Monócitos $CD14^+CD16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$ estão aumentados na obesidade, e diminuem após a perda de peso provocada por cirurgia bariátrica

Monócitos $CD14^+CD16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$ são classicamente conhecidos como subpopulações minoritárias de monócitos (Cros e col., 2010, Kawanaka e col., 2002), correspondendo a aproximadamente 10% dos monócitos circulantes de indivíduos saudáveis (Kawanaka e col., 2002) que aumentam de frequência em condições inflamatórias.

Neste trabalho realizamos a análise da frequência das três subpopulações de monócitos em indivíduos obesos antes e após a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica. Nossos resultados confirmam trabalhos anteriores e mostram que, embora o número de monócitos $CD14^+$ circulantes não esteja alterada em indivíduos eutróficos, obesos ou obesos diabéticos (Figura 18A), as subpopulações $CD14^+CD16^+$ (Figura 18 C) e $CD14^{dim}CD16^+$ (Figura 19D) encontram-se aumentada em todos os indivíduos obesos [OB], inclusive os diabéticos [OB/D]. Este aumento das subpopulações de monócitos que apresentam $CD16$ se deu em detrimento de uma diminuição dos monócitos $CD14^+CD16^-$ (Figura 18B), uma vez que a população de monócitos $CD14$ manteve-se inalterada entre os indivíduos analisados.

Um importante dado deste estudo foi a demonstração de que a perda de peso foi capaz de reduzir a frequência dos monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ três meses após a cirurgia bariátrica, tanto nos indivíduos obesos [OB/AC] como nos indivíduos obesos diabéticos [OB/D/AC] (Figura 18D). Entretanto, apesar de uma tendência à diminuição não foi observada uma diminuição significativa dos monócitos $CD14^+CD16^+$ circulantes nos indivíduos grupos [OB/AC] e [OB/D/AC] após a perda de peso (Figura 18C).

Figura 18 - Frequência das subpopulações de monócitos em indivíduos adultos eutróficos, obesos, obesos diabéticos, obesos após a cirurgia e obesos diabéticos após a cirurgia



Legenda: Monócitos sanguíneos obtidos de indivíduos eutróficos [C], obesos [OB] obesos diabéticos [OB/D], obesos após a cirurgia [OB/AC] e obesos diabéticos após a cirurgia [OB/D/AC] foram incubados com os anticorpos anti-CD14 conjugado a APC e anti-CD16 conjugado a FITC durante 20 minutos à 4°C. As populações foram obtidas e analisadas no BD FACS Vantage Cell Sorter. (A) Total de monócitos CD14 positivos (B) frequência da subpopulação de monócitos CD14⁺CD16⁻ (C) Frequência da subpopulação de monócitos CD14⁺CD16⁺ (D) Frequência da subpopulação de monócitos CD14^{dim}CD16⁺. Os resultados são representados em média ± erro padrão de 9 indivíduos eutróficos [C], 30 indivíduos obesos [OB], 15 indivíduos obesos diabéticos [OB/D], 12 indivíduos obesos após a cirurgia [OB/AC] e 6 indivíduos obesos diabéticos após a cirurgia [OB/D/AC].* p<0,05 em relação ao controle [C].

3.3 Perfil de expressão de genes associados aos processos de migração, adesão e produção de citocinas nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ e CD14⁺CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ de indivíduos obesos

Os macrófagos presentes no tecido adiposo desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade, uma vez que produzem uma grande quantidade de moléculas pro-inflamatórias que são então

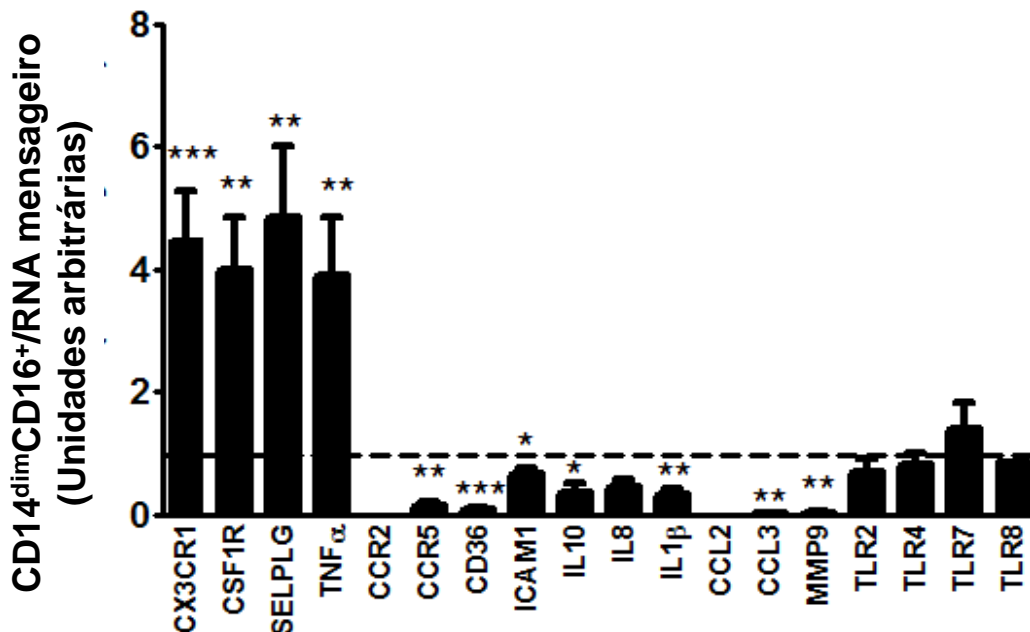
liberadas na circulação pelo tecido adiposo (Xu e col., 2003). Em humanos o aumento do tecido adiposo tem sido associado com a produção aumentada de marcadores inflamatórios circulantes que incluem moléculas de adesão (P-selectina, ICAM-1 e E-selectina plasmática) e citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , interleucina 6, interleucina 8) (Loffreda, 1998; Takahashi, 2003, Dalmas, 2011). Além disso, o tecido adiposo pode produzir e secretar diversos fatores quimiotáticos, como MCP-1, MIP 1, GM-CSF (Gerhardt, 2001), e fractalquina (Rachana e col., 2011).

Sabe-se que os macrófagos encontrados no tecido adiposo são provenientes dos monócitos circulantes originados na medula óssea (Weisberg e col. 2003). Neste contexto, as citocinas e quimiocinas têm uma função ímpar, pois são capazes de se ligar aos seus receptores promovendo a migração dos monócitos para diversos tecidos. Sendo assim, ao pensarmos o aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo, devemos atentar para possíveis mudanças em seus precursores, os monócitos, que facilitariam tal processo.

3.3.1 Perfil de expressão gênica dos monócitos e CD14^{dim}CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ na obesidade

Ao compararmos a expressão de genes relacionados à processos relacionados à migração, adesão e produção de citocinas pró-inflamatórias dos monócitos não clássicos em relação aos monócitos clássicos de indivíduos obesos observamos que a obesidade induz nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ um aumento nos níveis do RNA mensageiro para CX3CR1, CSF1R, SELPLG e TNF α . Além disso, observamos uma diminuição nos níveis de RNA mensageiro para CCR5, CD36, ICAM1, IL10, IL1 β , CCL3 e MMP9 e ausência de CCR2 e CCL2. Não observamos diferenças nos níveis de RNA mensageiro para IL8, TLR2, TLR4, TLR7 e TLR8 entre as subpopulações estudadas.

Figura 19 - Expressão gênica dos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ de indivíduos obesos

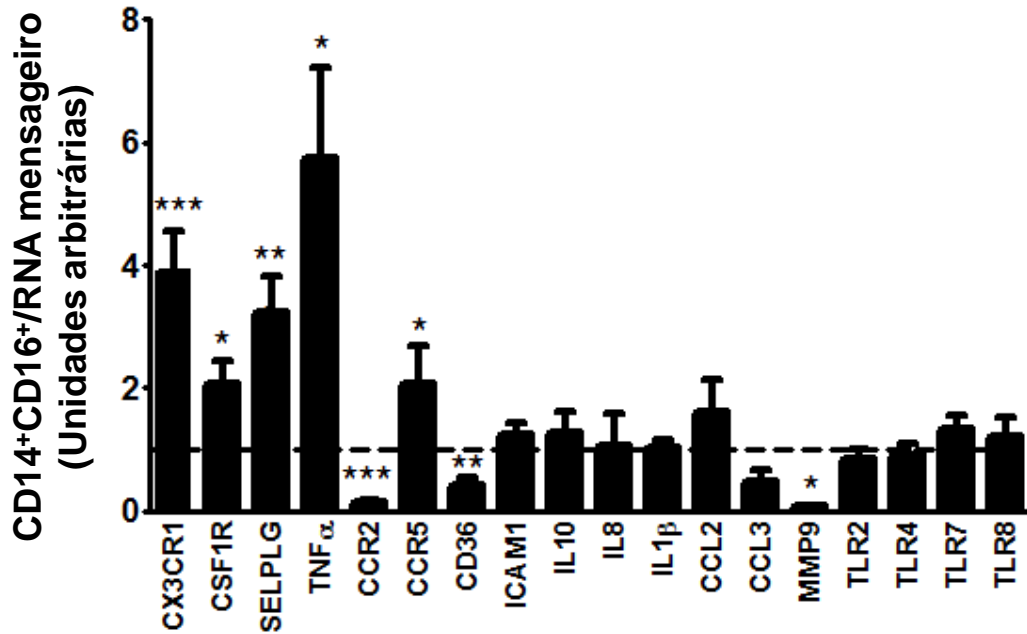


Legenda: Os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) e não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) obtidos de 7 indivíduos 7 indivíduos obesos [OB] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*” o RNA foi obtido e a obtenção das expressões gênicas foram obtidos a partir de Taqman Low Density Arrays. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs. CD14⁺CD16⁻.

3.3.2 Perfil de expressão gênica dos monócitos e CD14⁺CD16⁺ em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ na obesidade

Ao compararmos a expressão de genes relacionados à processos relacionados à migração, adesão e produção de citocinas pró-inflamatórias dos monócitos intermediários em relação aos monócitos clássicos de indivíduos obesos observamos que a obesidade induz nos monócitos CD14⁺CD16⁺ um aumento nos níveis do RNA mensageiro para CX3CR1, CSF1R, SELPLG, TNF α e CCR5. Além disso, observamos uma diminuição nos níveis de RNA mensageiro para CCR2, CD36 e MMP9. Não observamos diferenças nos níveis de RNA mensageiro para ICAM1, IL10, IL8, IL1 β , CCL2, CCL3, TLR2, TLR4, TLR7 e TLR8.

Figura 20 - Expressão gênica dos monócitos CD14⁺CD16⁺ de indivíduos obesos



Legenda: Os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) e intermediários (CD14⁺CD16⁺) obtidos de 7 indivíduos 7 indivíduos obesos [OB] foram purificados a partir da técnica "FACS Cell sorting" o RNA foi obtido e a obtenção das expressões gênicas foram obtidos a partir de Taqman Low Density Arrays. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs. CD14⁺CD16⁻.

3.4 Impacto da cirurgia bariátrica sobre a expressão gênica de receptores para citocinas e quimiocinas nos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺ em indivíduos adultos obesos

Está bem estabelecido o papel do tecido adiposo como modulador do processo inflamatório de baixo grau observado na obesidade. A importância do tecido adiposo deriva de sua capacidade de produção e secreção de moléculas envolvidas em inúmeras funções como metabolismo, secreção de insulina, reprodução, como também imunidade e inflamação (Mora e Pessin, 2002). Por outro lado, na obesidade a secreção aumentada de diversos fatores inflamatórios (Trayhurn e Wood, 2004) estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de resistência à insulina e a disfunção endotelial (Lyon e col., 2003; Ferroni e col., 2004; Dandona e col., 2005). As principais fontes desses fatores inflamatórios são os adipócitos aumentados e os macrófagos presentes no tecido adiposo (Anderson e col., 2010). Tem sido observado que a perda de peso nos indivíduos obesos se associa com a diminuição das concentrações circulantes de mediadores no sangue e no tecido adiposo (Laimer e col., 2002), levando a uma melhora do perfil inflamatório, juntamente com os parâmetros metabólicos e das funções endoteliais (Clément e col., 2004; Dalmas e col., 2011).

As intervenções que permitem a perda de peso podem ser classificadas em quatro grupos: dietas, atividade física, combinação de dieta e atividade física e intervenções cirúrgicas. Desta última, decorre a maior amplitude de perda de peso (3-50% ou 3-84 kg) quando nas intervenções com o by-pass gástrico (RYGB), que resulta em maiores perdas de peso – da ordem de 33%- enquanto a remoção de gordura e a cirurgia restritiva são responsáveis por 7 e 27% de perda de peso, respectivamente (Forsythe e col., 2008). Já foi demonstrado que a perda moderada de peso resulta em uma diminuição da expressão de genes relacionados à inflamação no tecido adiposo (Clément e col., 2004), além de proporcionar uma diminuição do número e mudanças na distribuição dos macrófagos no tecido adiposo (Canello e col., 2005). Considerando-se que os macrófagos do tecido adiposo derivam, em sua maioria, dos monócitos circulantes resolvemos avaliar a expressão de genes que relacionados aos processos de migração, adesão e manutenção das propriedades inflamatórias nas três subpopulações de monócitos antes e após a perda de peso induzida pelo by-pass gástrico, 3 meses após a cirurgia.

3.4.1 Análise da expressão gênica nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺

3.4.1.1. Comparação da expressão gênica de CX3CR1 e CCR5 nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ de indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após a cirurgia

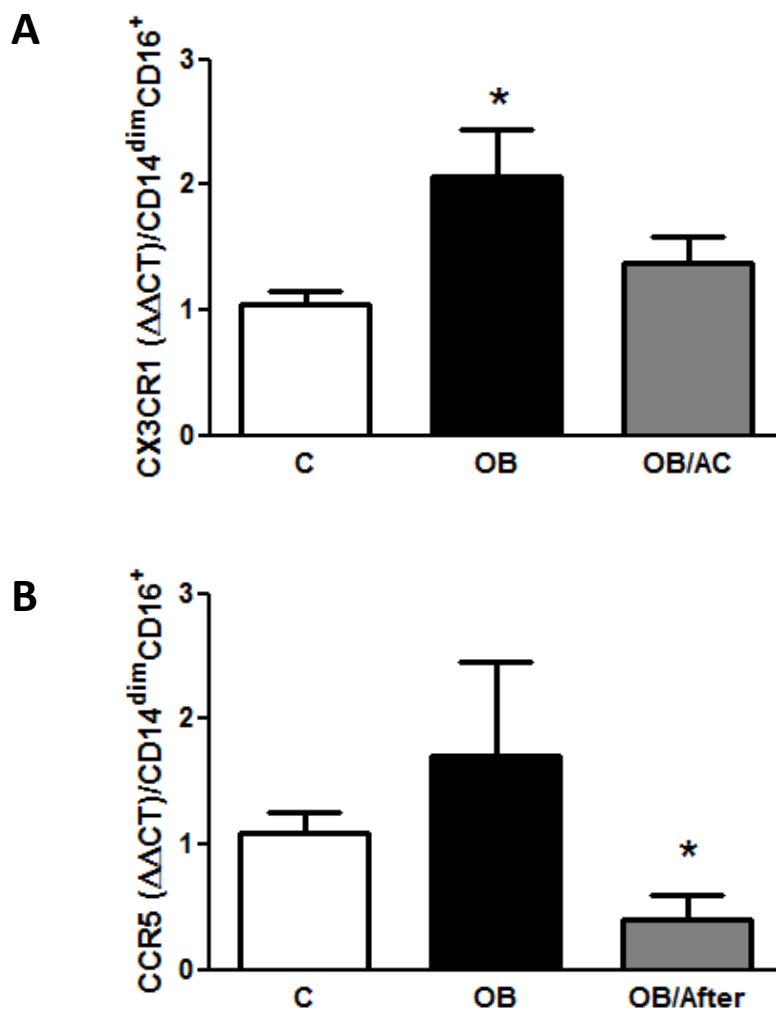
A **fractalquina (CX3CL1)** é uma quimiocina que atua através do seu receptor **CX3CR1** (D’Haese col., 2010). É encontrada como uma molécula de ligação transmembranar ou como glicoproteína solúvel (Bazan e col., 1997). Além de ser uma quimiocina pode atuar como uma molécula de adesão para monócitos, o que lhe confere um papel fundamental no recrutamento e adesão dessas células (D’Haese e col., 2010). Seu receptor, CX3CR1, é um receptor acoplado à proteína G e está envolvido na sobrevivência e ativação de monócitos (Lee e col., 2006), no recrutamento vascular de monócitos inflamatórios e no desenvolvimento de macrófagos nas lesões ateroscleróticas (Landsman e col., 2009). Recentemente a fractalquina foi identificada como uma nova quimiocina secretada pelo tecido adiposo em humanos, tanto pelos adipócitos quanto pela fração do estroma vascular. Seus níveis encontram-se aumentados no tecido adiposo de obesos o que poderia promover uma maior adesão de monócitos ao tecido adiposo (Shah e col., 2011). Nesse contexto é importante pensarmos no receptor CX3CR1 como tendo um possível papel decisivo no aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo encontrada na obesidade.

A função das proteínas inflamatórias de macrófagos **MIP-1 α** (CCL3) e **MIP-1 β** (CCL4), bem como a do **RANTES** (CCL5), bem como de seu receptor **CCR5** não são muito bem caracterizadas em doenças metabólicas (Charo e Ransohoff, 2006). Tais quimiocinas são liberadas por monócitos e sua produção é aumentada mediante o estímulo com lipopolissacarídeos (Bala e col., 2011). Sabe-se que em condições de diabetes do tipo 2, níveis sistêmicos aumentados de CCL5 são observados (Herder e col., 2005). Esta quimiocina também atua no recrutamento de monócitos para o tecido adiposo (Keophiphath e col., 2010). Dados recentes e ainda não publicados mostraram que a secreção de MIP-1 α , MIP-1 β e CCL5 está aumentada no tecido adiposo de indivíduos obesos (Dalmas, comunicação pessoal). Contudo, o papel do receptor CCR5 no recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo não está elucidado.

Com relação à expressão do RNA mensageiro para o receptor CX3CR1 nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺, observamos que a obesidade induziu um aumento em seus níveis como visto

no grupo OB. A perda de peso por 3 meses não foi suficiente para reverter tal quadro, observamos uma pequena tendência de diminuição do receptor em questão (Figura 21A). Já em relação ao CCR5, observamos uma tendência de aumento no grupo OB, e vimos que a perda de peso exerceu um importante efeito na diminuição dos níveis desse receptor no grupo OB/AC, visto que os níveis de expressão do mesmo mostraram-se diminuídos em relação ao grupo C. (Figura 21B).

Figura 21 - Expressão de CX3CR1 e CCR5 na subpopulação $CD14^{dim}CD16^{+}$ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



Legenda: Monócitos $CD14^{dim}CD16^{+}$ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de CX3CR1 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CCR5 entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

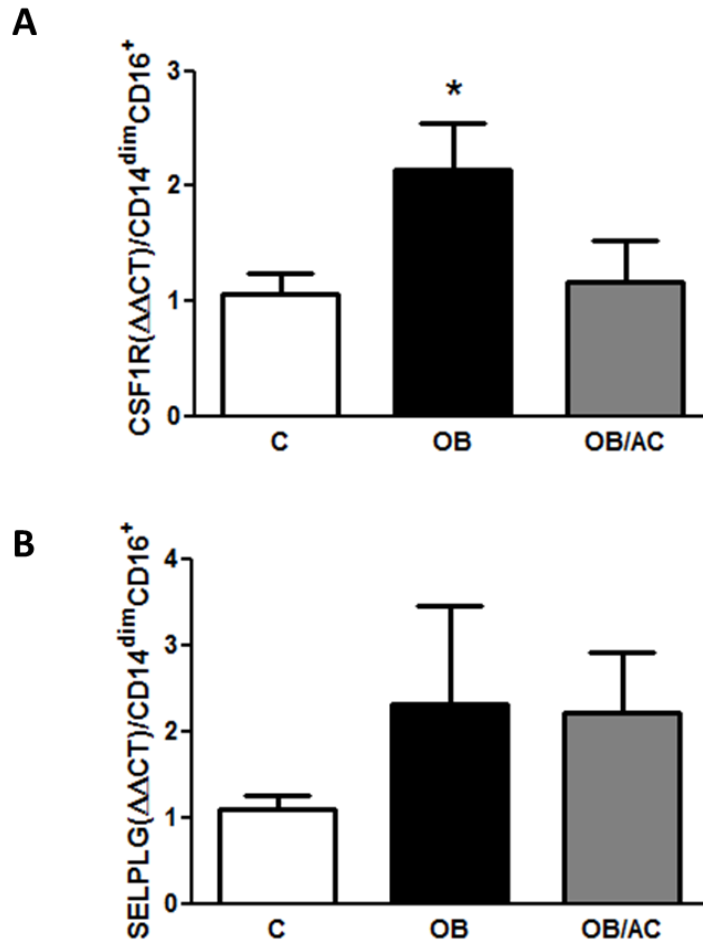
3.4.1.2 Comparação da expressão gênica de CSF1R e SELPLG nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

O fator estimulante da formação de colônia em macrófagos (**CSF1**) é um regulador essencial da homeostase de macrófagos. É capaz de atuar nas células - alvo através de sua ligação com seu receptor o **CSF1-R**, que possui atividade quinásica. Normalmente o CSF1 está presente na circulação (10ng/ml), porém seus níveis circulatórios aumentam em diversas doenças como infecções, câncer, doenças inflamatórias crônicas independentemente da etiologia. Em condições de inflamação o CSF1 pode ser produzido por macrófagos e *in vitro* é capaz de acelerar a diferenciação de monócitos em fagócitos ativos (Hume e Macdonald, 2011). Além disso, o CSF1 apresenta um papel crucial no desenvolvimento e migração do sistema fagocítico mononuclear (Auffray e col., 2009).

A P-selectina (**SELP**) é um membro da família de moléculas de adesão endoteliais da selectina envolvida no rolamento de leucócitos, mediando as interações dos leucócitos com o endotélio, plaquetas com o endotélio e leucócitos com plaquetas. Nestes processos, faz-se necessária a presença do seu ligante, o ligante 1 da P-selectina (**SELPLG ou PGS1-1**) na superfície dos leucócitos. Diversos estudos suportam a evidência de que a SELP e o SELPLG possuem uma função primordial na formação da lesão aterosclerótica, trombose e mudanças na parede arterial. A principal função biológica da dupla SELP- SELPLG é na superfície celular, onde medeiam a interação dos leucócitos e plaquetas ao endotélio (Volcik e col., 2009), podendo ter sua expressão induzida por citocinas inflamatórias com a IL-1 e TNF α (Bevilacqua e col., 1994). Estudos recentes mostraram um aumento de SELPLG no tecido adiposo de camundongos *db/db* e de camundongos selvagens alimentados com dieta hiperlipídica, além disso, já foi demonstrado que o bloqueio do mesmo resulta na diminuição das reações inflamatórias (Sato e col., 2011).

Ao compararmos os níveis de expressão de CSF1R nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ observamos que a obesidade induziu sua maior expressão gênica no grupo OB. A perda de peso, por sua vez, parece induzir uma tendência de diminuição de seus níveis como visto no grupo OB/AC (figura 22A). Já com relação aos níveis de SELPLG, observamos uma pequena tendência de aumento no grupo OB, e que a perda de peso não alterou seus níveis de expressão no grupo OB/AC (Figura 22B).

Figura 22 - Expressão de CSF1R e SELPLG na subpopulação $CD14^{dim}CD16^{+}$ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



Legenda: Monócitos $CD14^{dim}CD16^{+}$ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de CSF1R entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de SELPLG entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

3.4.1.3 Comparação da expressão gênica de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ nos monócitos $CD14^{dim}CD16^{+}$ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

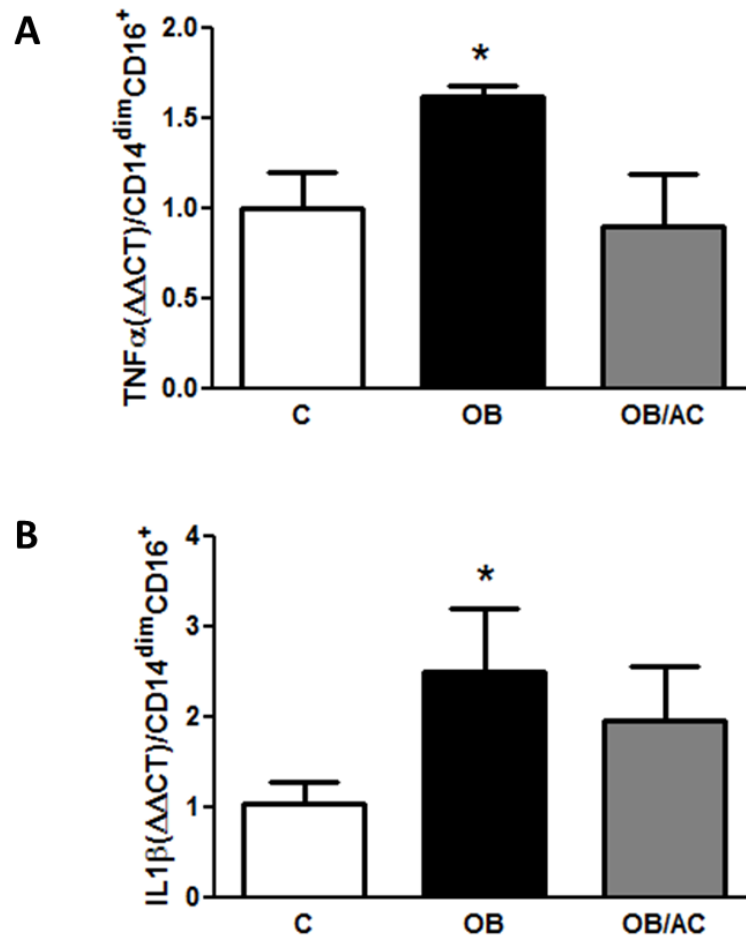
O fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) é sintetizado como uma proteína transmembranar de 26 kDa, a qual posteriormente sofre clivagem a partir da ação de uma metaloprotease sendo liberado na circulação como uma molécula de $TNF\alpha$ solúvel de 17kDa (Kriegler e col.,

1988). Adipócitos isolados e diferenciados são capazes de produzir TNF α e por isso foram apontados como a principal fonte dos níveis aumentados de TNF α em condições de obesidade. No entanto, já se sabe que os macrófagos da fração do estroma vascular constituem a fonte principal de TNF α derivado do tecido adiposo e que os níveis aumentados desta citocina na obesidade se devem ao aumento da infiltração de macrófagos do tipo M1 nesse tecido (Weisberg e col., 2003).

Juntamente com o TNF α , a interleucina 1 β (IL1 β) é considerada como uma citocina prototípica. Fain e colaboradores demonstraram *in vitro* que sua liberação pelo tecido adiposo é 50% maior no tecido de indivíduos obesos (Fain e col., 2004). A interleucina 10 (IL-10) é considerada uma citocina anti-inflamatória capaz de atuar coordenadamente com citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Mocellin e col., 2003). Níveis aumentados desta citocina são encontrados em indivíduos obesos (Esposito e col., 2003), o que possivelmente decorre de um mecanismo de “feedback” na tentativa de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Fain e col., 2004).

As comparações entre os níveis de TNF α e IL1 β nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ entre os grupos C e OB, revelaram que a obesidade induziu um aumento nos seus níveis, como visto no grupo OB (Figuras 23A e 23B, respectivamente). A perda de peso possibilitada pela cirurgia bariátrica não alterou os níveis de expressão de tais genes nos grupos OB/AC (Figuras 23A e 23B, respectivamente).

Figura 23 - Expressão de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ na subpopulação $CD14^{dim}CD16^+$ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



Legenda: Monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de $TNF\alpha$ entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de $IL1\beta$ entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

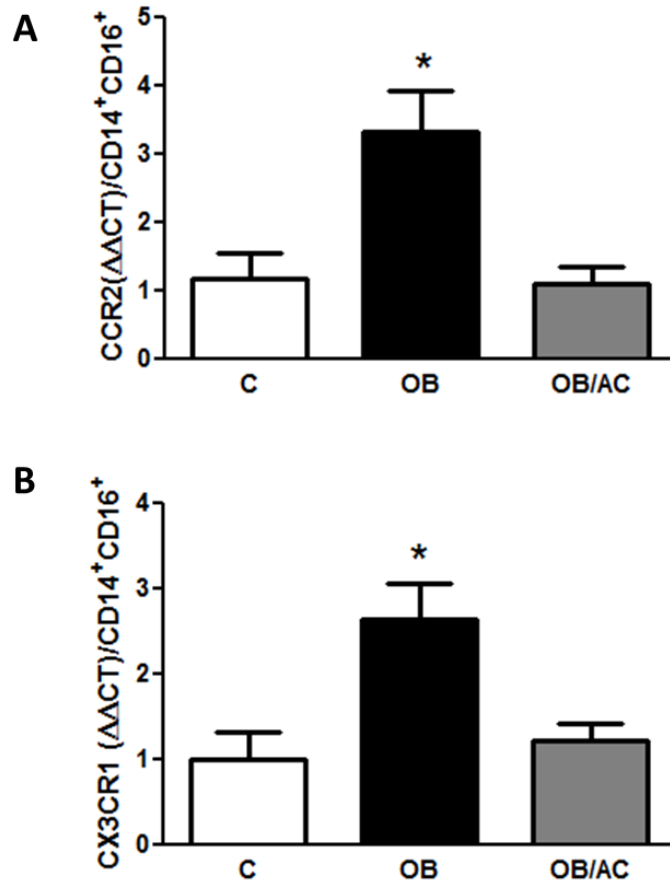
3.4.2 Análise da expressão gênica nos monócitos CD14⁺CD16⁺

3.4.2.1 Comparação da expressão gênica de CCR2 e CX3CR1 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

É sabido que os adipócitos são capazes de secretar **MCP-1**, o qual é exercido seus efeitos biológicos a partir de sua ligação com o seu receptor **CCR2**. Em condições de obesidade observa-se um aumento de sua secreção pelo tecido adiposo (Sartipy e col., 2003). Além disso, a deleção de CCR2 é capaz de reduzir a infiltração de macrófagos, formação de células espumosas, progressão da aterosclerose (Boring e col., 1998) e diminuir o número de macrófagos no tecido adiposo (Boring e col., 2005; Weisberg e col., 2006).

As comparações entre as expressões gênicas de CCR2 e CX3CR1 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os grupos C e OB revelaram que a obesidade induziu o aumento dos mesmos, como visto no grupo OB (Figuras 24A e 24B, respectivamente). E de maneira interessante observamos que a perda de peso por três meses induziu no grupo OB/AC o retorno dos níveis de expressão gênica de CCR2 e CX3CR1 aos valores do grupo C (Figuras 24A e 24B, respectivamente).

Figura 24 - Expressão de CCR2 e CX3CR1 na subpopulação CD14⁺CD16⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



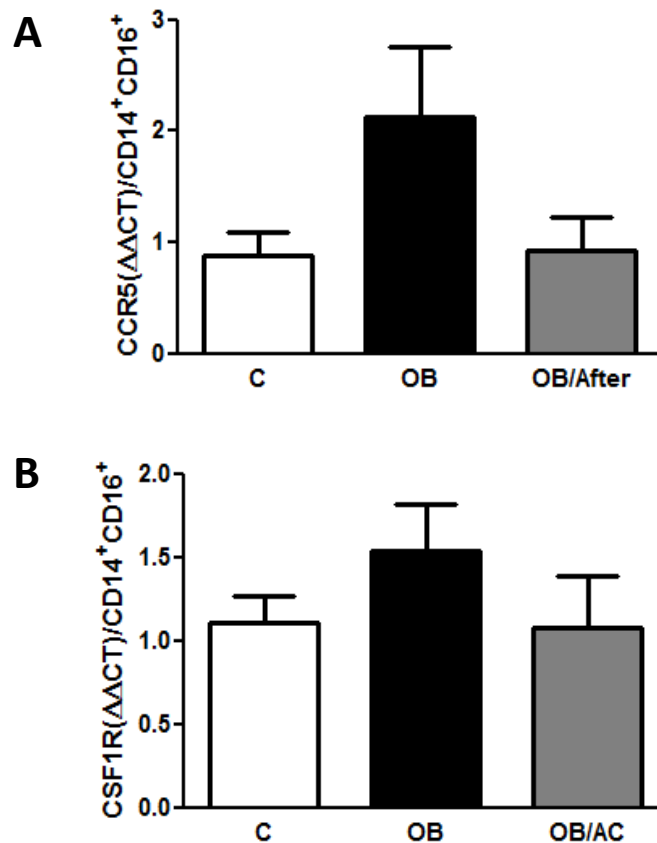
Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de CCR2 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CX3CR1 entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média ± erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

3.4.2.2 Comparação da expressão gênica de CCR5 e CSF1R nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Ao compararmos os níveis de expressão do receptor CCR5 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os grupos C e OB observamos uma grande tendência de aumento no grupo OB, e que perda de peso após a cirurgia bariátrica aboliu tal tendência (Figura 25A). Já

com relação aos níveis de CSF1R não observamos diferenças nas comparações entre os grupos C, OB B e OB/AC (Figura 25B).

Figura 25 - Expressão de CCR5 e CSF1R na subpopulação CD14⁺CD16⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



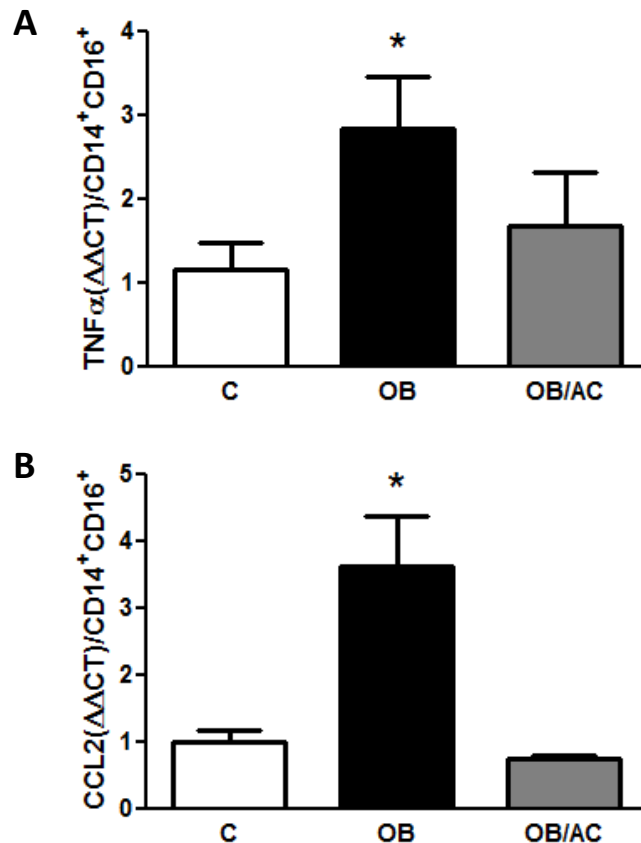
Legenda: Monócitos CD14^{dim}CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de CCR5 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CSF1R entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média ± erro padrão. * p < 0,05 em relação ao grupo [C].

3.4.2.3 Comparação da expressão gênica de TNFα e CCL2 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Ao compararmos os níveis de expressão TNFα e CCL2 na subpopulação CD14⁺CD16⁺ entre os grupos C e OB, observamos que a obesidade induziu aumento de suas

expressões gênicas (Figuras 26A e 26B, respectivamente). A perda de peso induzida por cirurgia bariátrica levou à diminuição nos níveis de RNA mensageiro para ambas as citocinas no grupo OB/AC (Figura 28A e 28B, respectivamente).

Figura 26 - Expressão de TNF- α e CCL2 na subpopulação CD14⁺CD16⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



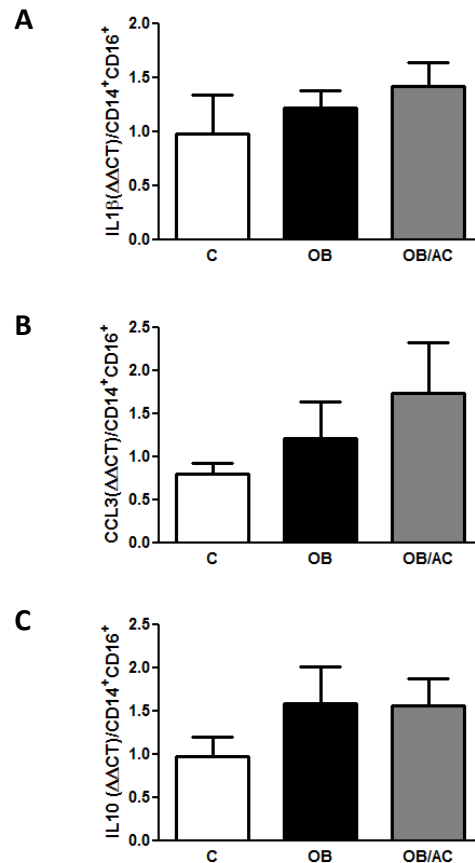
Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de TNF α entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CCL2 entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

3.4.2.4 Comparação da expressão gênica de IL1 β , CCL3, IL10 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Ao compararmos diversos genes responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas nos monócitos CD14⁺CD16⁺ não observamos diferenças nos níveis de expressão

de IL1 β , CCL3 e IL10, entre os grupos C,OB e OB/AC (Figuras 27A, 27B e 27C, respectivamente).

Figura 27 - Expressão de IL1 β , CCL3 e IL10 na subpopulação CD14⁺CD16⁺ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de IL1 β entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CCL3 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (C) comparação da expressão de IL10 entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo [C].

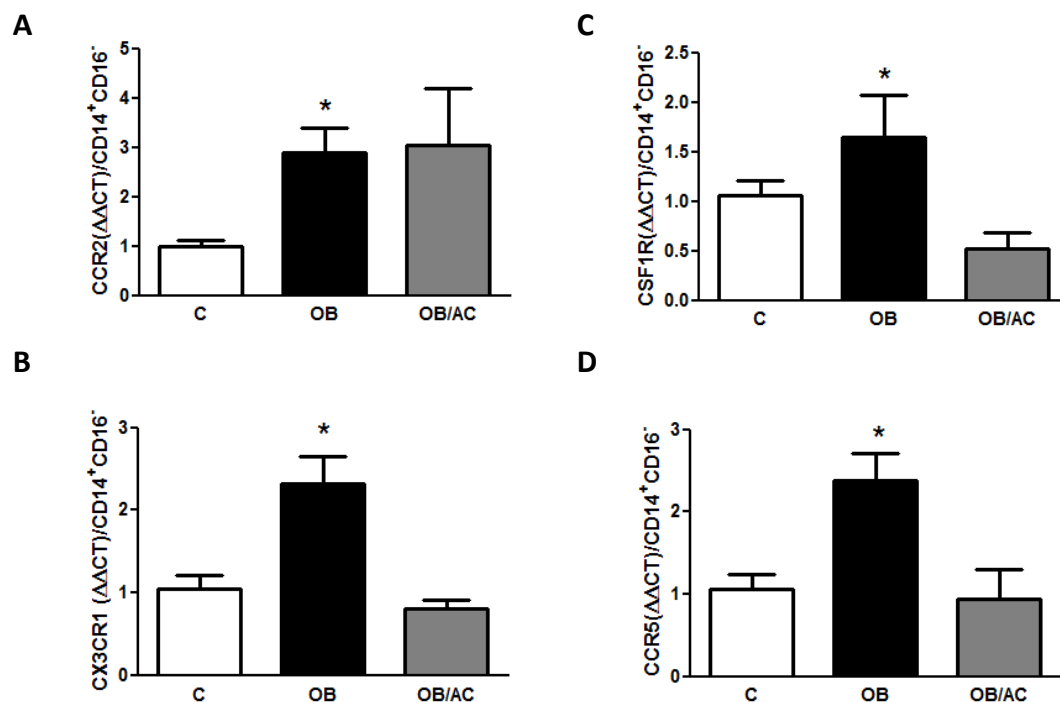
3.4.3 Análise da expressão gênica nos monócitos CD14⁺CD16⁻

3.4.3.1 Comparação da expressão gênica de CCR2, CX3CR1, CCR5 e CSF1R nos monócitos CD14⁺CD16⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Ao compararmos os níveis de expressão de CCR2 nos monócitos CD14⁺CD16⁻ observamos um aumento no RNA mensageiro para o mesmo no grupo OB, porém a perda de

peso possibilitada pela cirurgia bariátrica não alterou os níveis de expressão de CCR2 (Figura 28A). Já com relação aos níveis de expressão do receptor CX3CR1 observamos de maneira bastante interessante que a obesidade induziu seu aumento, como observado no grupo OB e que a cirurgia bariátrica foi capaz de diminuir seus níveis de expressão (Figura 28B), como observado no grupo OB/AC. Os níveis de expressão de CSF1R apresentaram uma leve tendência de aumento no grupo OB, a qual foi revertida com a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica, como observado no grupo OB/AC (Figura 28C). De maneira semelhante, observamos uma tendência de aumento nos níveis de CCR5 induzida pela obesidade, como visto no grupo OB que foi revertida pela perda de peso, como observado no grupo OB/AC (Figura 28D).

Figura 28 - Expressão de CCR2, CX3CR1, CSF1R e CCR5 na subpopulação CD14⁺CD16⁻ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso

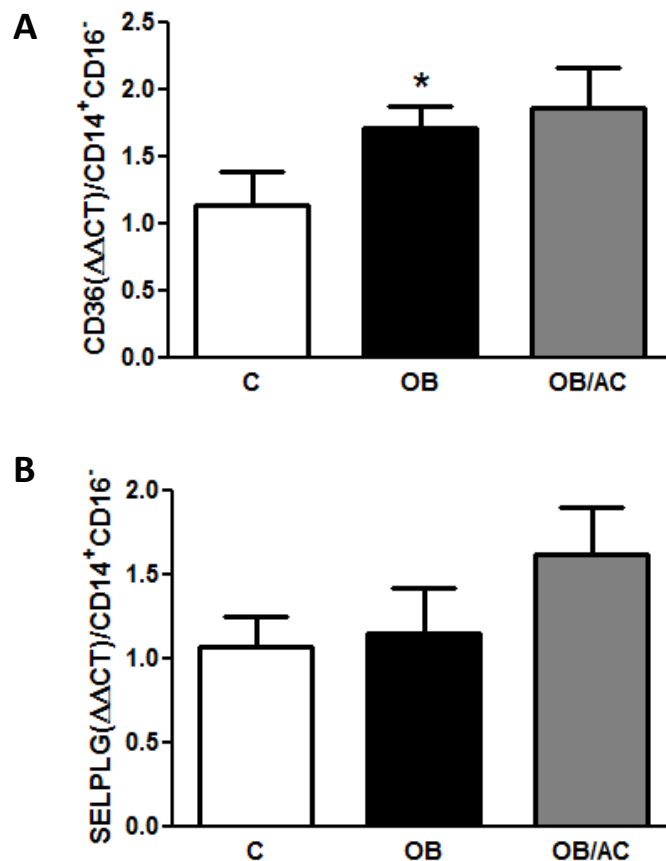


Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “FACS Cell sorting”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pelas barras em cinza. Em (A) comparação da expressão de CCR2 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de CX3CR1 entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (C) comparação da expressão de CSF1R entre os grupos C, OB e OB/AC. Em (D) comparação da expressão de CCR5 entre os grupos C, OB e OB/AC. Os resultados são representados em média ± erro padrão. * p < 0,05 em relação ao grupo [C].

3.4.3.2 Comparação da expressão gênica de CD36 e SELPLG nos monócitos CD14⁺CD16⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Com relação aos níveis de expressão de CD36 nos monócitos CD14⁺CD16⁻ observamos um aumento na obesidade, como visto no grupo OB, contudo a perda de peso não induziu alteração nos níveis dessa molécula, como visto no grupo OB/AC (Figura 29A). Já com relação ao SELPLG vimos que tanto a obesidade como a perda de peso não modificaram seus níveis na subpopulação de monócitos em questão (Figura 29 B).

Figura 29 - Expressão de CD36 e SELPLG na subpopulação CD14⁺CD16⁻ em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁺ obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*”. As expressões gênicas foram obtidas a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em cinza, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas e o grupo [OB/AC] é indicado pela barra pontilhada. Em (A) comparação da expressão de CD36 entre os grupos C e OB e entre os grupos OB e OB/AC. Em (B) comparação da expressão de SELPLG entre os grupos C e OB e entre os grupos OB e OB/AC.

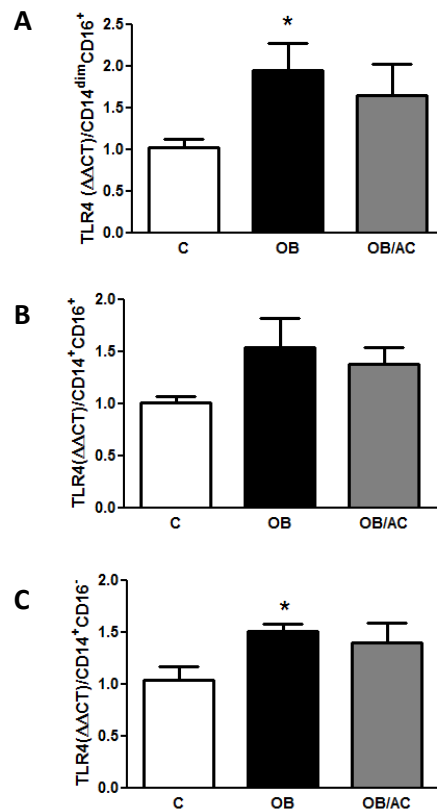
3.4.4. Análise da expressão gênica de TLR's nos monócitos CD14^{dim}CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD16⁻

Diversas evidências suportam a existência de uma ligação entre as funções metabólicas e imunológicas. Por exemplo, exposição a patógenos ou a componentes associados a patógenos podem interromper a função metabólica sistêmica e em contrapartida, distúrbios metabólicos da homeostase poderiam levar a alterações nas respostas imunes (Schaffler e Scholmerich, 2010). Toll-like receptors (TLRs) são uma família de receptores de reconhecimento de padrões, os quais desempenham um papel fundamental no sistema imune inato através da ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias (Ajuwon e Spurlock, 2005) em resposta a padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs), como lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e diversas proteínas (Aderem e Ulevitch, 2000; Akira e col., 2001). TLRs humanos podem ser classificados com base em sua distribuição subcelular: TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão normalmente localizados em compartimentos intracelulares, enquanto TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são geralmente expressos na superfície das células (Akira e col., 2006). Ambos TLR7 e TLR8 são receptores naturais para o RNA de fita única sendo capazes de atuar como potentes ativadores da resposta imune inata em infecções virais (Schön e Schön, 2008).

3.4.4.1 Comparação da expressão gênica de TLR4 nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺, CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Com relação ao efeito da obesidade sobre os níveis de expressão de TLR4 observamos um aumento de seus níveis nas subpopulações CD14^{dim}CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ enquanto na subpopulação CD14⁺CD16⁺ observamos apenas uma sutil tendência ao aumento (Figuras 30A, 30B e 30C, respectivamente). Entretanto observamos que a perda de peso não alterou os níveis de expressão de TLR4 nas subpopulações CD14^{dim}CD16⁺, CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺D16⁻, como visto no grupo OB/AC (Figuras 30A, 30B e 30C, respectivamente)

Figura 30 - Expressão de TLR4 três subpopulações de monócitos em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



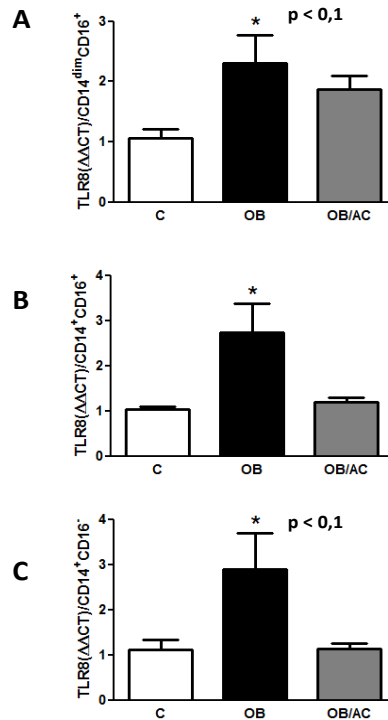
Legenda: Os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*” o RNA foi obtido e a obtenção das expressões gênicas foram obtidos a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em branco, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas (B) e grupo[OB/AC] é indicado pela barra em cinza . Os resultados são representados em média ± erro padrão. * p < 0,05 em relação ao grupo [C] .

3.4.4.2 Comparação da expressão gênica de TLR8 nos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos após cirurgia

Nossos resultados demonstraram de maneira bastante interessante que a obesidade induz um aumento dos níveis de expressão gênica de TLR8 nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺(Figura 31A), CD14⁺CD16⁺ (Figura 31B) e CD14⁺CD16⁻ (Figura 31C), sugerindo uma importante função de TLR8 nos monócitos em condições de obesidade. Além disso, observamos que a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica foi eficiente em promover uma diminuição dessa expressão nas subpopulações CD14⁺CD16⁺ (Figura 31B) e

CD14⁺CD16⁻(Figura 31C), porém não promoveu alterações nos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ (Figura 31A).

Figura 31 - Expressão de TLR8 três subpopulações de monócitos em indivíduos eutróficos, obesos e obesos após perda de peso



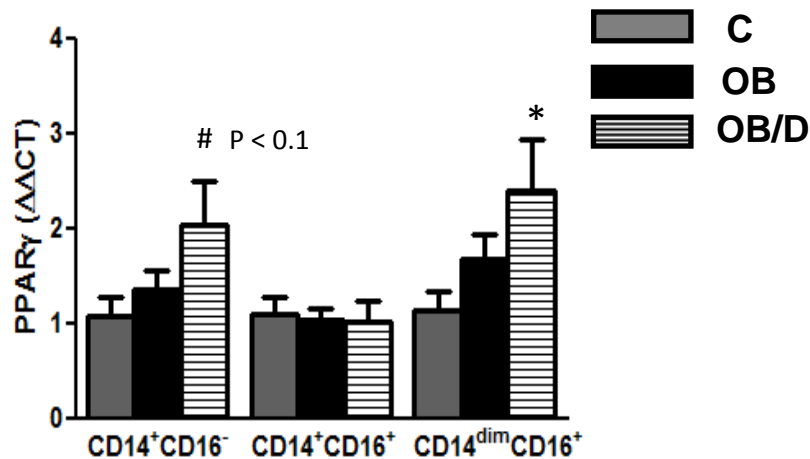
Legenda: Os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 6 indivíduos obesos antes [OB] e três meses após a cirurgia bariátrica [OB/AC] foram purificados a partir da técnica “*FACS Cell sorting*” o RNA foi obtido e a obtenção das expressões gênicas foram obtidos a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em cinza, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas (B) e grupo [OB/AC] é indicado pela barra pontilhada. Os resultados são representados em média ± erro padrão. * p < 0,05 em relação ao grupo [C].

3.4.5 Comparação da expressão gênica de PPAR γ nos monócitos CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ entre os indivíduos adultos eutróficos, obesos e obesos diabéticos

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) γ é um fator de transcrição que regula um grande número de genes importantes para o metabolismo de lipídios e lipoproteínas bem como para a homeostase da glicose e para a inflamação (Duval e col., 2002). A ativação de PPAR γ exerce seus efeitos benéficos através da regulação da expressão de receptores relacionados à inflamação e à fisiopatologia da diabetes do tipo 2 em diversos tipos celulares (Smith, 2003) incluindo monócitos/macrófagos (Fernandez, 2008).

Nossos resultados curiosamente demonstraram um aumento dos níveis de expressão gênica de PPAR γ nas subpopulações CD14⁺CD16⁻ e CD14^{dim}CD16⁺ em indivíduos obesos diabéticos [OB/D] em comparação aos indivíduos eutróficos [C]. É importante ressaltar, que a obesidade por si só, não induziu tais aumentos (Figura 32).

Figura 32 - Expressão de PPAR γ nas três subpopulações de monócitos em indivíduos eutróficos, obesos e obesos diabéticos



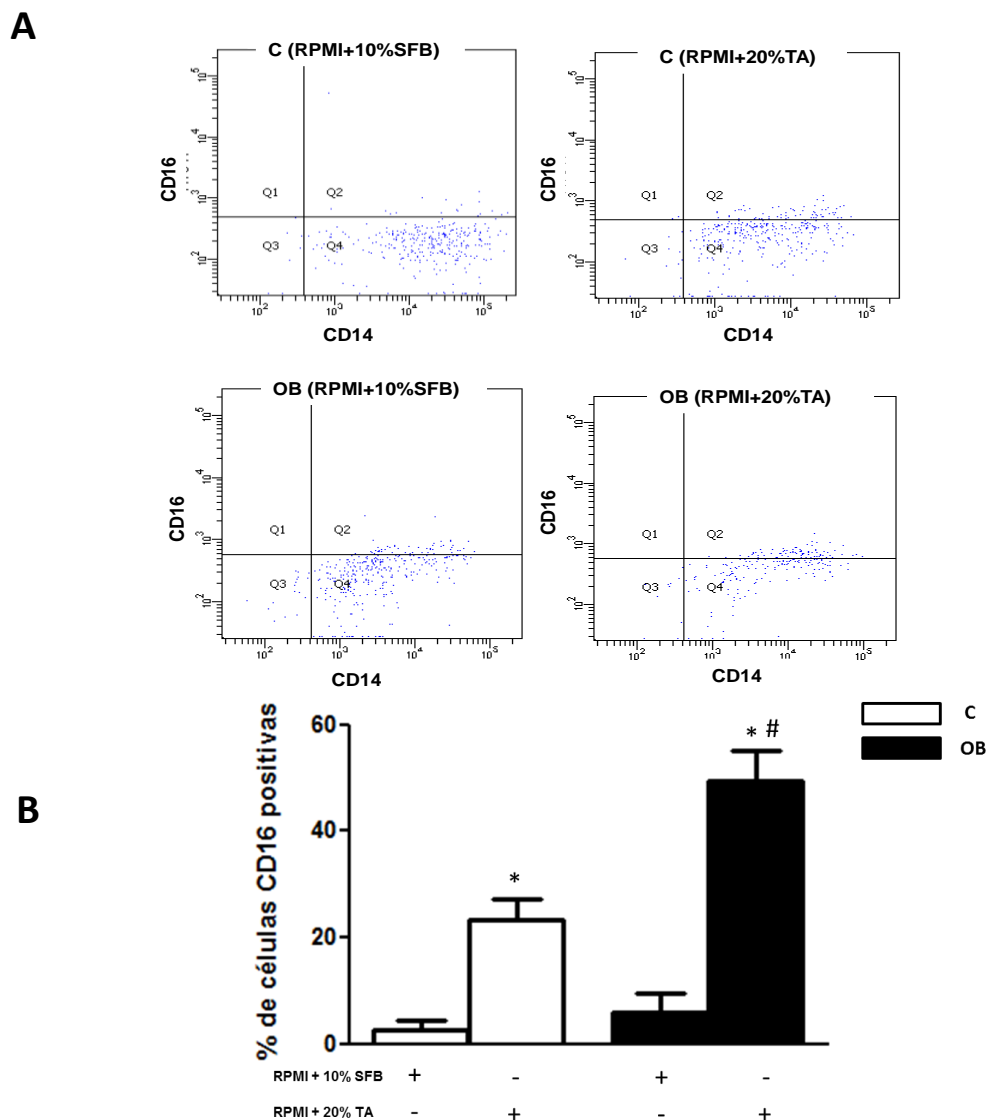
Legenda: Os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) obtidos de 7 indivíduos eutróficos [C] e 7 indivíduos obesos [OB] 6 indivíduos obesos diabéticos [OB/D] foram purificados a partir da técnica "FACS Cell sorting" o RNA foi obtido e a obtenção das expressões gênicas foram obtidos a partir de Taqman Low Density Arrays. O grupo [C] é indicado pelas barras em cinza, o grupo [OB] é representado pelas barras pretas (B) e grupo [OB/D] é indicado pela barra tracejada. Os resultados são representados em média \pm erro padrão. * p < 0,05 em relação ao grupo [C] e # p < 0,1 em relação ao grupo [C].

3.5 Efeito do meio condicionado secretado pelo tecido adiposo visceral sobre o fenótipo de monócitos CD14⁺CD16⁻

Estudos de maturação de monócitos *in vitro* demonstraram que os monócitos que expressam os tanto os receptores CD14 como CD16 podem ser desenvolvidos a partir de monócitos CD14⁺CD16⁻. Tal fato indica que os monócitos CD14⁺CD16⁺ são mais maduros que os monócitos CD14⁺CD16⁻ (Ziegler-Heitbrock e col., 1993) o que é corroborado pelas suas similaridades com macrófagos (PandzićJaksić e col., 2010). Já é demonstrado que os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) expressam diversos genes que indicam um estado anti-apoptótico e proliferativo. Já os monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) e os não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) expressam genes relacionados aos processos de diferenciação celular, e os monócitos não clássicos apresentam, ainda um estado pró-apoptótico e anti-proliferativo

sugerindo um maior grau de maturação. Nesse contexto, caracteriza-se a subpopulação intermediária como uma subpopulação de transição entre os monócitos clássicos e não clássicos (Wong e col., 2011). Tendo em vista o exposto acima e o fato de que em indivíduos obesos as duas subpopulações de monócitos $CD16^+$ estão aumentadas (Poitou e col., 2011) resolvemos investigar se o meio condicionado proveniente de explante de tecido adiposo visceral de adultos obesos seria capaz de induzir a diferenciação dos monócitos $CD14^+CD16^-$. Nossos achados mostraram de maneira extremamente interessante que em contato com o meio condicionado do TA visceral os monócitos $CD14^+CD16^-$ passaram a expressar em sua superfície o receptor CD16. Nossos resultados demonstram que monócitos $CD14^+CD16^-$ de indivíduos eutróficos são capazes de expressar CD16 quando tratados com o meio condicionado, além disso, percebemos que os monócitos clássicos de indivíduos obesos apresentaram um potencial de diferenciação duas vezes maior que o de indivíduos eutróficos (Figura 33).

Figura 33 - Diferenciação de monócitos $CD14^+CD16^-$ em monócitos $CD14^+CD16^+$



Legenda: Monócitos CD14⁺CD16⁻ obtidos de três indivíduos eutróficos [C] e 3 indivíduos obesos [OB] foram purificados a partir da técnica “FACS Cell sorting”. 1x10⁴ células por poço foram incubadas por 18 horas com meio RPMI completo (RPMI +10% SFB) ou com meio RPMI + 20% do meio condicionado obtido a partir da cultura de explante de tecido adiposo visceral (RPMI + 20% TA). Após a incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo para a detecção de presença dos receptores de superfície CD14 e CD16. (A) Imagem representativa obtida a partir da citometria de fluxo (B) Gráfico representativo das imagens em A. Os resultados são representados em média ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao grupo C incubado com meio RPMI completo e # p<0,05 em relação ao grupo C incubado como meio RPMI + 20% TA.

4 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm evidenciado a heterogeneidade dos monócitos sanguíneos, com base na expressão diferencial dos marcadores CD14 e CD16. Em humanos, três subpopulações de monócitos são descritas: (i) os monócitos clássicos ($CD14^+CD16^-$); (ii) os monócitos intermediários ($CD14^+CD16^+$); e (iii) os monócitos não clássicos ($CD14^{dim}CD16^+$) (Saha e col., 2010; Heimbeck e col., 2010).

Uma grande atenção tem sido dada aos monócitos caracterizados pela presença de CD16, uma vez que esta população apresenta-se aumentada em doenças como sepse (Fingerle e col., 1993), infecção por HIV (Allen e col., 1991), artrite reumatóide (Kawanaka e col., 2002; Wijngaarden e col., 2003) e, mais recentemente, detectada na obesidade (Cottam e col., 2002; Rogacev e col., 2010; Poitou e col., 2011). Além disso, estudos recentes têm proposto um papel funcional dessas três subpopulações em indivíduos saudáveis (Ziegler-Heitbrock e col., 2010; Zawada e col., 2011). A importância de células $CD16^+$ na obesidade ($CD14^{dim}CD16^+$ e $CD14^+CD16^+$) se reafirma quando da observação que sua frequência é aumentada no quadro obeso e diminui com a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica em Y de Roux (Poitou e col., 2011). Contudo, sabe-se muito pouco sobre essas diferentes subpopulações nas desordens relacionadas ao processo inflamatório, principalmente na obesidade. Ao nos concentrarmos no papel primordial dos macrófagos como uma célula chave na inflamação do tecido adiposo obeso (Figura 10), a caracterização dos monócitos emerge como um elemento facilitador da compreensão do estabelecimento desse processo inflamatório.

Portanto, uma vez que na obesidade o número aumentado de macrófagos presentes no tecido adiposo parece estar relacionado à sua severidade e levando em consideração que os monócitos sanguíneos são precursores dos macrófagos teciduais, decidimos caracterizar fenotipicamente as subpopulações de monócitos em indivíduos obesos e nestes após a perda de peso.

Através da utilização da estratégia de purificação das subpopulações de monócitos por “FACS cell sorting”, tivemos acesso às subpopulações de monócitos que se apresentaram, aproximadamente, com 98% de pureza (esquema representativo na Figura 16). A partir daí, através da utilização de múltiplos “microarrays”, pautamos nossas análises com base nos padrões de expressão de diversos genes nas subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis, obesos e obesos diabéticos. Além disso, acessamos o perfil de expressão gênica

das três subpopulações três meses após a perda de peso facilitada pela cirurgia bariátrica, um procedimento bem estabelecido para a redução da massa gorda, bem como para a melhora do status metabólico e redução da inflamação de baixo grau observada na obesidade severa (Poitou e col., 2011).

Inicialmente analisamos e comparamos os níveis de expressão de RNA mensageiro para diversos genes envolvidas nos processos de migração, adesão, fagocitose e produção de citocinas dos monócitos não-clássicos e intermediários em relação aos monócitos clássicos de indivíduos obesos. Considerando a população $CD14^+CD16^-$ como referência, a população $CD14^{dim}CD16^+$ do grupo obeso foi caracterizada por um aumento de aproximadamente 4 vezes na expressão $CX3CR1$, $CSF1R$, $SELPLG$, e $TNF\alpha$ e uma expressão diminuída de $CCR2$, $CCR5$, $CD36$, $ICAM1$, $IL10$, $IL1\beta$, $CCL3$ e $MMP9$, além de ausência dos níveis de $CCR2$ e $CCL2$. Esses resultados demonstram que apesar de sua capacidade prejudicada de migrar em resposta ao MCP-1, os monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ são capazes de migrar em resposta à fractalquina e CSF1. Além disso, nossos achados de que os níveis de expressão gênica de $SELPLG$ estavam aumentados fortalecem a possível capacidade desses monócitos de migrarem para o tecido adiposo, uma vez que a molécula $SELPLG$ está envolvida no recrutamento de monócitos para o tecido adiposo (Sato e col., 2011). De maneira interessante, os monócitos $CD14^+CD16^+$ apresentam um perfil de expressão gênica similar aos monócitos não clássicos, com exceção de $CCR5$ o qual é duas vezes mais expresso. Mais uma vez nossos resultados sugerem que os monócitos intermediários devem possuir propriedades inflamatórias diferentes e podem ainda migrar em resposta à $MIP-1\alpha$, $MIP-1\beta$ A e $CCL5$ (Charo and Ransohoff, 2006). Em conjunto esses resultados sugerem que os monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ e os monócitos $CD14^+CD16^+$ possuem capacidade de migração e adesão diferentes da subpopulação $CD14^+CD16^-$. Além disso, essas duas subpopulações apresentam um fenótipo mais inflamatório devido aos seus altos níveis de expressão gênica de $TNF\alpha$. Devemos destacar que aliado ao fato dessas duas subpopulações estarem aumentadas na obesidade a expressão aumentada dos níveis de $TNF\alpha$ se amplifica ainda mais na obesidade. Esses resultados destacam a importância do $TNF\alpha$ na obesidade. Como citado anteriormente, a maioria dos macrófagos do tecido adiposo se origina a partir dos monócitos circulantes, que são recrutados para o tecido adiposo por diversos quimioatraentes produzidos tanto pelos adipócitos hipertrofiados como pelas células imunes presentes no mesmo (Mraz e col., 2011). Ao considerarmos que os monócitos $CD16^+$ encontram-se aumentados na obesidade e que essas duas subpopulações de monócitos expressam níveis gênicos aumentados de diversas moléculas relacionadas ao recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, é possível que

esses monócitos tenham sua migração e acúmulo facilitado em tecidos inflamados como o tecido adiposo (Ferrante, 2007; Dahlman e col., 2005).

Em outro conjunto de análises dos nossos dados resolvemos investigar para cada subpopulação os níveis de expressão dos genes já mencionados entre os grupos C e OB. É importante ressaltar que para tais análises utilizamos o grupo C como grupo de referência. Além disso, analisamos se a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica induziu modificações nas expressões gênicas, e mais uma vez utilizamos como referência o grupo C. Ao analisarmos a subpopulação de monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ observamos que a obesidade induziu o aumento dos níveis de expressão gênica de CX3CR1 e CSF1R bem como observamos uma tendência de aumento da expressão gênica de SELPLG e IL-1 β e que a perda de peso induziu uma tendência da diminuição dos níveis de expressão de CX3CR1 e CSF1R. Tais resultados reforçam o papel crítico dos monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ na manutenção da inflamação do tecido adiposo, a qual seria mediada em parte por CX3CR1, CSF1R e SELPLG. Estudos demonstram que a perda de peso contribui para a diminuição de macrófagos no tecido adiposo (Kováčiková, 2010) e de maneira interessante, no presente estudo, encontramos níveis de expressão gênica diminuídos para diversas moléculas que podem estar envolvidas nas diferentes propriedades migratórias dos monócitos $CD14^{dim}CD16^+$. Dessa forma, sugerimos que a diminuição da frequência desses monócitos observada após a perda de peso, bem como a expressão diminuída de CX3CR1 e CSF1R devem contribuir para a melhora as condições inflamatórias observadas na obesidade, em parte pelo bloqueio parcial da migração desses monócitos em direção ao tecido adiposo. Monócitos intermediários também estão aumentados na circulação de indivíduos obesos podendo contribuir para a inflamação de baixo grau encontrada na obesidade. Além dos níveis de expressão gênica aumentados de CX3CR1 os monócitos $CD14^+CD16^+$ também apresentaram uma expressão aumentada de CCR5, e ao compararmos os diversos genes na subpopulação $CD14^+CD16^+$ entre os indivíduos eutróficos e obesos observamos que a obesidade induziu um aumento da expressão gênica de CX3CR1, a qual diminui drasticamente após a perda de peso induzida pela cirurgia; em adição, a cirurgia bariátrica também proporcionou uma diminuição nos níveis de expressão gênica de CCR5, contribuindo possivelmente para uma diminuição do número de macrófagos em tecidos inflamados, o que corrobora um estudo conduzido por Braunersreuther e col. (2007) em modelos murinos, onde a deficiência em CCR5 reduziu a infiltração de macrófagos em placas de ateroma em estágios avançados, levando a um fenótipo mais estável (Braunersreuther e col., 2007). Nós também demonstramos que os monócitos $CD14^+CD16^+$ de indivíduos obesos apresentam um fenótipo

pró-inflamatório, que pode ser caracterizado pelos níveis de expressão aumentados de TNF α e CCL2, destacando seu papel nas doenças inflamatórias. Sendo assim, podemos concluir que os monócitos CD14⁺CD16⁺ de indivíduos obesos apresentam uma expressão alterada de genes relacionados aos processos migratórios, fator esse que pode aumentar sua infiltração em tecidos inflamados e promover a progressão da inflamação. Tais afirmações estão de acordo com estudos anteriores, os quais demonstraram que monócitos/macrófagos provavelmente participam da regulação da atividade pró-inflamatória do tecido adiposo (Weisberg e col., 2003). Além disso, a redução dos níveis de expressão de TNF α e CCL2 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ observada nos pacientes que sofreram cirurgia é consistente com estudos anteriores, que demonstraram que a perda de peso leva a redução da ativação inflamatória das células mononucleares periféricas em indivíduos obesos (Sheu e col., 2008). Monócitos CD14⁺CD16⁻ são conhecidos pelos seus níveis elevados de CCR2 (Poitou e col., 2011), o que os faz capazes de migrar em resposta ao CCL2. Nossos resultados demonstraram que os monócitos CD14⁺CD16⁻ de indivíduos obesos apresentaram aumento dos níveis de expressão gênica de CCR2, CX3CR1, sugerindo, novamente, um fenótipo mais migratório, no qual os mesmos são capazes de migrar também em resposta à fractalquina. Além disso, a perda de peso induziu uma diminuição nos níveis gênicos de CX3CR1, CCR5 e CSF1R nessa subpopulação, contribuindo para a diminuição das capacidades migratórias adquiridas na obesidade, o que levaria a uma melhora do quadro inflamatório. Nós ainda observamos que os monócitos clássicos de indivíduos obesos apresentaram níveis aumentados de CD36. O CD36 é receptor sequestrador da classe B, o qual funciona na captação de ácidos graxos de cadeias longas e de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDLs) (Kennedy e col., 2011). Seus níveis aumentados em monócitos têm sido associados com resistência à insulina e níveis séricos elevados de diversos marcadores inflamatórios (Handberg e col., 2010). Levando-se em consideração que o CD36 é capaz de mediar uma interação pró-inflamatória entre macrófagos e adipócitos, sugerimos que os níveis aumentados de CD36 encontrados nos monócitos CD14⁺CD16⁻ desempenhe um papel importante no recrutamento de monócitos e na inflamação do tecido adiposo observada em estudos conduzidos *in vivo*. Dado o fato de que o CD36 reconhece ácidos graxos de cadeia longa bem como ligantes que iniciam a resposta inflamatória imune inata e são também capazes de mediar a fagocitose de células apoptóticas, vamos ainda além ao especularmos que tal molécula poderia se constituir em um importante elo entre a migração de monócitos/macrófagos para o tecido adiposo na tentativa de fagocitar os adipócitos mortos.

Com base no padrão de expressão de citocinas, receptores de adesão e quimiotáticos, sugerimos que as subpopulações $CD14^{dim}CD16^+$ e $CD14^+CD16^+$ apresentam propriedades migratórias e adesivas distintas daquelas observadas para a monócitos clássico $CD14^+CD16^-$. Está bem estabelecido que em resposta à MCP-1 (CCL2), os monócitos migram para sítios inflamatórios (Ziegler-Heitbrock, 2007). Assim, uma vez que o tecido adiposo é capaz de secretar MCP-1 (Poitou e col., 2011) e que monócitos $CD14^+CD16^-$ possuem níveis elevados de CCR2 (receptor de MCP-1), temos na obesidade um fator que, dentre outros, contribuiria para o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo.

Por outro lado, os monócitos $CD16^+$ ($CD14^+CD16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$) apresentam expressão gênica elevada de CX3CR1, indicando sua capacidade migratória em direção à fractalquina. A fractalquina (CX3CL1) é uma quimiocina que exerce seus efeitos biológicos através da ligação com o seu receptor CX3CR1 e está implicada no recrutamento e adesão dos monócitos em situações patológicas como na aterosclerose, desordens reumatológicas e infecção por HIV (D'Haese, 2010). O CX3CR1 exerce ainda um papel fundamental na ativação e sobrevivência de leucócitos e no recrutamento vascular de monócitos inflamatórios, culminando no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas ricas em macrófagos (Shah e col., 2011). Recentemente, Shah e col. (2011) demonstraram que tanto os níveis de fractalquina como sua secreção pelo tecido adiposo (adipócitos e células do estroma vascular) estão aumentados na obesidade, contribuindo para a adesão de monócitos. A fractalquina emergiu recentemente como uma nova quimiocina secretada pelo tecido adiposo, passível de modular o recrutamento de monócitos para este tecido (Shah e col., 2011). Assim, uma vez que tanto os monócitos $CD14^+CD16^+$ como $CD14^{dim}CD16^+$ apresentam elevada expressão gênica de CX3CR1 na obesidade, sugerimos que a fractalquina secretada pelo tecido adiposo contribuiria significativamente para a maior infiltração de monócitos $CD16^+$ no tecido adiposo no obeso.

Foi anteriormente demonstrado que o aumento na frequência dos monócitos $CD16^+$ se relaciona diretamente com doenças cardiovasculares (Schlitt e col., 2004) e com a diminuição da camada íntima dos vasos - fator utilizado como diagnóstico para aterosclerose subclínica em pacientes com doenças renais (Nockher e col., 1998; Heine e col., 2008). Nas placas de ateroma, a interação entre as células musculares lisas e os monócitos propicia formação de células espumosas, conduzindo à aterogênese (Doran e col., 2008). Por sua vez, a fractalquina e o CX3CR1 se relacionam com o estabelecimento da placa aterosclerótica em coronárias humanas (Lucas em col., 2003). Nesse cenário, a fractalquina funciona como uma molécula quimiotática e/ou de adesão, que facilita a transmigração de monócitos para as áreas

ateroscleróticas (Fong e col., 1998), além de atuar na regulação da diferenciação e sobrevivência dos monócitos (Lucas e col., 2003). Com base no exposto, sugerimos que a frequência aumentada dos monócitos CD16⁺ em indivíduos obesos facilitaria, ao menos em parte, o estabelecimento da aterosclerose através do eixo CX3CL1/CX3CR1.

Nossos dados demonstraram também que os monócitos CD16⁺ expressam níveis gênicos aumentados do receptor de CSF1, CSF1R (também conhecido como CD115, c-fms ou receptor M-CSF). Este possui atividade de tirosina quinase e alta afinidade por seu ligante, o fator estimulador de colônia-1 (CSF-1) (Auffray e col., 2009; Wei e col., 2010). O CSF-1, por sua vez, é capaz de regular a sobrevivência, proliferação e diferenciação de fagócitos mononucleares (Cecchini e col., 1994; Wei e col., 2010) e pode ser encontrado localmente nos tecidos e na circulação (Cecchini e col., 1994). No tecido adiposo, já foi descrita a presença de CSF-1 (Levine e col., 1998; Harman-Boehm e col., 2007), embora seus efeitos locais sobre a infiltração e/ou ativação de macrófagos não foram esclarecidos. A partir dos nossos resultados, sugerimos que o aumento dos níveis de expressão de CSF1R nos monócitos desempenhe um papel tanto no acúmulo de monócitos/macrófagos no tecido adiposo, em resposta ao CSF-1, como também, provavelmente, na diferenciação dessas células.

O receptor SELPLG foi descrito como uma molécula crucial no recrutamento de monócitos para o tecido adiposo de camundongos obesos (Sato e col., 2011). Mostramos neste trabalho que indivíduos obesos apresentam uma tendência de aumento da expressão gênica de SELPLG em monócitos CD16⁺. Uma vez que no estado inflamatório ocorre um aumento da expressão de P-selectina no endotélio vascular (Klintman e col., 2004), é concebível propor que os monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺, através da maior expressão do receptor para essa molécula de adesão, apresentem uma maior capacidade adesiva e migratória, podendo infiltrar-se mais facilmente no tecido adiposo obeso.

Um dado do presente estudo que consideramos importante foi o aumento da expressão gênica do receptor CCR5 nos monócitos CD14⁺CD16⁺ de indivíduos obesos, em comparação com os eutróficos. Tal resultado é consistente com outros estudos recentes que demonstram que esses monócitos se caracterizam por expressarem os maiores níveis desse receptor (Gordon e Taylor, 2005; Wong, 2011). O receptor de quimiocinas CCR5, bem conhecido por seu papel na infecção por HIV, possui três ligantes: proteína inflamatória de monócitos (MIP)-1 α , (CCL3), MIP-1 β (CCL4) e RANTES (CCL5). Estudos conduzidos em modelos animais têm revelado que as quimiocinas CCL3 e CCL5 que se ligam ao CCR5 se relacionam com a progressão da placa aterosclerótica (Jones e col., 2011) e que sua expressão gênica está

aumentada nos tecido adiposo visceral e subcutâneo de indivíduos obesos (Huber e col., 2008). Recentemente, Keophiphath e colaboradores (2010) demonstraram que o CCL5 é capaz de estimular a adesão e a transmigração de monócitos humanos em direção ao meio condicionado de tecido adiposo visceral, *in vitro*. Sendo assim, nossos resultados vêm complementar o estudo em questão e nos permite propor que os monócitos CD14⁺CD16⁺, devido a expressão aumentada CCR5 contribuiriam, para o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo em resposta às quimiocinas CCL3 e CCL5 liberadas localmente.

Diversos estudos apontam o LPS como um potente indutor do aumento de transcrição e tradução de TNF α em monócitos CD16⁺ (Belge, 2002; Ziegler-Heitbrock, 2007), o que levou a caracterização dessas populações como pró-inflamatórias (Ziegler-Heitbrock, 2007). Nossos resultados mostraram um aumento da expressão gênica de TNF α nos monócitos CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ de indivíduos obesos mesmo sem qualquer estímulo *in vitro*, como o LPS por exemplo, sugerindo que tais monócitos sejam realmente pró-inflamatórios. Em conjunto, tais achados nos levam a re-afirmar que os monócitos CD16⁺ apresentam modificações nas capacidades migratórias, além de se caracterizarem em um fenótipo mais pró-inflamatório, especialmente na obesidade

Receptores do tipo Toll (TLRs) são uma família de receptores que reconhecem e detectam padrões associados aos componentes de microrganismos, dessa forma desempenham um papel crítico no sistema imune inato através da ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias (Medzhitov, 2001). Uma vez que TLRs desempenham papéis tanto em células imunes como no tecido adiposo, tem sido proposto que os mesmos se constituam em um possível elo entre a imunidade e o metabolismo. Nesse campo de investigação alguns estudos têm elucidado o envolvimento de TLR2 e TLR4 em funções metabólicas bem como nas respostas imune inatas na obesidade (Shi e col., 2006; Fresno, 2011).

Outro achado interessante do presente estudo foram os níveis de expressão gênica aumentados de TLR4 nas subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14^{dim}CD16⁺ de indivíduos obesos. Sabe-se que o TLR4 pode ser ativado por lipopolissacarídeos de bactérias (LPS) e ácidos graxos, esses últimos que estão aumentados na obesidade (Shi e col., 2006), sendo assim propomos que ácidos graxos livres ativem via TLR4 essas duas subpopulações de monócitos induzindo nas mesmas um fenótipo pró-inflamatório. Além disso, levando-se em consideração que os ácidos graxos secretados pelos adipócitos hipertrofiados poderiam servir como ligantes para TLR4 (Dalmas e col., 2011), sugerimos que esses níveis aumentados de TLR4 observados nos monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14^{dim}CD16⁺ possam

favorecer sua migração para o tecido adiposo a fim de que fagocitem os ácidos graxos liberados no espaço extracelular pelos adipócitos hipertrofiados.

Além disso, demonstramos pela primeira vez que a obesidade induz um aumento de TLR8 em monócitos. Nossos resultados demonstraram que indivíduos obesos apresentam um aumento na expressão de TLR8 nos monócitos $CD14^{dim}CD16^+$, $CD14^+CD16^+$ e $CD14^+CD16^-$ quando comparados grupo C. Mais interessante ainda, observamos que a perda de peso reduziu a expressão gênica de TLR8 nas subpopulações $CD14^+CD16^-$ e $CD14^+CD16^+$ de monócitos. O TLR8 é um TLR endossomal que se liga ao RNA de fita simples sendo expresso em monócitos humanos (Cros e col., 2010). Já foi demonstrado que ácidos nucleicos circulantes podem ser detectados em algumas doenças como alguns tipos de câncer (Brase e col., 2010), diabetes do tipo 2 (Kocic e col., 2009) e doenças cardiovasculares (Zhu e Fan, 2011). Porém, apesar de não termos encontrado em literatura evidências que mostrem um aumento de ácidos nucleicos circulantes na obesidade, sugerimos que os TLR8 presente nas diferentes subpopulações de monócitos dos obesos sejam capazes detectar além dos ácidos nucleicos circulantes outros ligantes ainda não conhecidos, que não RNAs virais de fita única.

A Síndrome antifosfolipídica (APS) é uma doença autoimune caracterizada por elevadas concentrações de anticorpos antifosfolipídicos (aPLs). Apesar de não serem ligantes de TLRs os aPLs são capazes de induzir a expressão de TLR8 e sua sinalização dependente em monócitos, o que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que tal mecanismo se dê através da ativação da NADPH oxidase endossomal com subsequente produção de superóxido, culminando na indução da expressão de TLR8 de maneira NF κ B dependente, além de potencializar sua sensibilidade aos seus ligantes naturais (Prinz e col., 2011). Levando-se em consideração que indivíduos que apresentam a síndrome antifosfolipídica primária são frequentemente obesos (Karin e Jozélio, 2011), podemos sugerir que os indivíduos obesos poderiam apresentar um quadro tal qual semelhante à síndrome antifosfolipídica, o que resultaria em um aumento na expressão de TLR8 nesses monócitos.

O receptor de peroxissomo ativado por proliferação (PPAR γ) é um receptor nuclear ativado por ligante com potentes propriedades anti-inflamatórias capaz de modular a resposta inflamatória (Chinetti e col., 2003), o qual é abundantemente expresso em macrófagos, onde sua expressão é rapidamente induzida em consequência da diferenciação de monócitos em macrófagos (Chinetti e col., 1998). Entretanto, apesar de suas conhecidas propriedades pró-inflamatórias nossos resultados mostraram, surpreendentemente, um aumento da expressão de PPAR γ nos monócitos $CD14^+CD16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$ de indivíduos obesos diabéticos em

relação aos indivíduos eutróficos. Faz-se importante ressaltar que ao compararmos os níveis de expressão de PPAR γ entre os indivíduos eutróficos e obesos não observamos diferenças quanto à sua expressão (Figura 43). É estabelecido que a ativação de PPAR γ pré-ativa os monócitos em direção a um fenótipo do tipo M2, assim sugerindo uma função anti-inflamatória em monócitos (Bouhlef e col., 2007). Mas por outro lado, o aumento da expressão de PPAR γ nos monócitos clássicos e não clássicos poderia induzir um aumento de diferenciação de monócitos em macrófagos novos durante as condições de diabetes. Recentemente demonstrou-se que indivíduos obesos apresentam uma polarização de monócitos prejudicada em direção ao fenótipo M2 induzida por IL-4 através da perda de expressão alguns marcadores clássicos da ativação alternativa de macrófagos, tais resultados sugerem que os monócitos de indivíduos obesos seriam refratários à aquisição do fenótipo M2 (Bories e col., 2011). Sendo assim, podemos sugerir que apesar do aumento de PPAR γ nas subpopulações clássicas e não clássicas de indivíduos obesos e diabéticos tais monócitos não necessariamente se diferenciariam no fenótipo alternativo e sim poderiam se tornar macrófagos que apresentam propriedades tanto de macrófagos M1 como de macrófagos M2.

Como já citado anteriormente no presente estudo as subpopulações de monócitos que apresentam o receptor de superfície CD16 estão aumentadas em diversas condições inflamatórias crônicas, como por exemplo, a obesidade (Poitou e col., 2011); porém os mecanismos que conduzem a esse aumento ainda não são conhecidos. Estudos recentes mostram que nessas condições encontram-se subpopulações de monócitos em diferentes graus de maturação, onde os monócitos clássicos seriam os mais imaturos e os não clássicos atingiriam o grau máximo de maturação (Sadeghi e col., 1999; Seidler e col., 2010). Já a população intermediária, como o próprio nome já diz, apresentaria um grau de diferenciação compreendido entre as duas outras subpopulações, caracterizando um grau de maturação intermediário (Wong e col., 2011). Sendo assim, investigamos se o tecido adiposo seria capaz de produzir e/ou secretar moléculas capazes de induzir tal diferenciação. E observamos que monócitos CD14⁺CD16⁻ tratados com o meio condicionado obtido a partir do tecido adiposo visceral de indivíduos obesos passaram a expressar o receptor CD16, o que em parte poderia explicar o aumento nas subpopulações CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺ encontrados na obesidade. Sendo assim, descrevemos pela primeira vez que o aumento na frequência dos monócitos CD16⁺ observada na obesidade pode ser resultado da liberação de diversos mediadores pelo tecido adiposo hipertrofiado. Sendo assim, é tentador especularmos que o aumento dessas subpopulações de monócitos na obesidade se estabeleça a partir da inflamação crônica no tecido adiposo, liberando citocinas que atuam diretamente na

maturação dos monócitos clássicos em intermediários e não clássicos, e que estes últimos, por sua vez, contribuam para a progressão da inflamação do tecido adiposo, ao migrarem em direção ao mesmo, o que se constituiria em um círculo vicioso de manutenção e amplificação do eixo em questão.

Por fim, é importante ressaltar que em virtude das claras dificuldades metodológicas encontradas para a realização de trabalhos em humanos, modelos animais são cada vez mais utilizados. Sendo assim, grande parte do conhecimento sobre os diferentes tipos de monócitos deriva de estudos conduzidos em modelos murinos. Portanto, é necessário termos em mente que comparações diretas entre as duas espécies em questão pode conduzir a conclusões equivocadas em muitas situações. Por exemplo, está claro em literatura que monócitos humanos $CD14^+CD16^-$ e $CD14^+CD16^+$ compartilham diversas características com os monócitos murinos “inflamatórios” $GR1^+$ e que a molécula $CD16$ pode ser caracterizada um marcador de ativação (Cros e col., 2010; Saha e Geissmann, 2011). Por outro lado, foi demonstrado que os monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ compartilham características com os monócitos murinos $GR1^-$, considerados “patrolheiros” da vasculatura e associados à funções de reparo tecidual (Auffray e col., 2007; Nahrendorf e col., 2007). Contudo a caracterização das três subpopulações de monócitos humanos quanto ao seu caráter inflamatório é uma tarefa difícil, pois ao nos basearmos no observado em murinos, tenderíamos a classificar os monócitos $CD14^+CD16^+$ e $CD14^+CD16^-$ como os verdadeiros monócitos pró-inflamatórios enquanto os monócitos $CD14^{dim}CD16^+$ seriam os monócitos anti-inflamatórios. Porém, nosso trabalho demonstrou claramente que na obesidade os monócitos $CD14^+CD16^+$ e $CD14^{dim}CD16^+$ se caracterizam por um perfil pró-inflamatório, sobretudo pela elevada expressão gênica da $TNF\alpha$. Se formos ainda mais além, nos deparamos com a questão crucial: quais subpopulações de monócitos dariam origem aos macrófagos M1 e M2? Tal questão ainda não pode ser respondida, mas com base em nossos resultados mostramos que a obesidade altera claramente o padrão de expressão gênica de moléculas relacionadas aos processos de migração e adesão dos monócitos, onde monócitos outrora destinados à maturação em direção ao fenótipo M2 originam os macrófagos M1; ou então que em decorrência das modificações nos monócitos precursores dos macrófagos M2, estes tendam a um “switch” para o fenótipo M1 em resposta ao ambiente inflamatório, haja visto o tecido adiposo.

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que a obesidade implementa nas subpopulações de monócitos classificadas como $CD14^+CD16^-$ (clássicos), $CD14^+CD16^+$ (intermediários) $CD14^{dim}CD16^+$ (não clássicos), expressão gênica diferenciada de moléculas relacionadas às funções migratórias, de adesão e inflamação, possivelmente contribuindo para o aumento da infiltração de monócitos/macrófagos no tecido adiposo.

Mostramos ainda que um dos mecanismos responsáveis pelo aumento das subpopulações de monócitos $CD16^+$ ($CD14^{dim}CD16^+$ e $CD14^+CD16^+$) na obesidade poderia decorrer da maturação dos monócitos $CD14^+CD16^-$, em resposta a fatores secretados pelo tecido adiposo de indivíduos obesos. Ademais, foi mostrado que a perda de peso inicia um processo de restauração do fenótipo dos monócitos em direção a um perfil menos inflamatório e neste contexto, ressaltamos que os receptores, CCR2, CCR-5 e especialmente CX3CR1 poderiam desempenhar um papel central neste processo e que receptores Toll, como o TLR-4 e TLR8, devem exercer um papel primordial no estabelecimento e manutenção das propriedades pró-inflamatórias observadas em monócitos.

Tabela 2 - Quadro comparativo das expressões gênicas nas três subpopulações

	OB vs C	OB/AC vs C
CD14^{dim}CD16⁺		
<i>CX3CR1</i>	↑	↔
<i>CCR5</i>	↔	↓
<i>CSF1R</i>	↑	↔
<i>SELPLG</i>	↔	↔
<i>TNFα</i>	↑	↔
<i>IL1β</i>	↑	↔
<i>TLR4</i>	↑	↔
<i>TLR8</i>	↑	↔
CD14⁺CD16⁺		
<i>CCR2</i>	↑	↔
<i>CX3CR1</i>	↑	↔
<i>CCR5</i>	↔	↔
<i>CSF1R</i>	↔	↔
<i>TNFα</i>	↑	↔
<i>CCL2</i>	↑	↔
<i>IL1β</i>	↔	↔
<i>CCL3</i>	↔	↔
<i>IL10</i>	↔	↔
<i>TLR4</i>	↔	↔
<i>TLR8</i>	↑	↔
CD14⁺CD16⁻		
<i>CCR2</i>	↑	↔
<i>CX3CR1</i>	↑	↔
<i>CSF1R</i>	↔	↔
<i>CCR5</i>	↔	↔
<i>CD36</i>	↑	↔
<i>SELPLG</i>	↔	↔
<i>TLR4</i>	↑	↔
<i>TLR8</i>	↑	↔

REFERÊNCIAS

- Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E., and Grimaldi, P. A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 17665–17668.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000; 406:782–7.
- Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr.* 2005; 135:1841-6.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2:675–80.
- Allen JB, Wong HL, Guyre PM, Simon GL, Wahl SM. Association of circulating receptor FcRIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-. *J Clin Invest.* 1991; 87:1773–9.
- Anne M. Wolf, Kristina A. Woodworth. Obesity Prevention: Recommended Strategies and Challenges. *The American Journal of Medicine.* 2009; 122, S19 –S23
- Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:172–7
- Aronne LJ, Wadden T, Isoldi KK, Woodworth KA. When prevention fails: obesity treatment strategies. *Am J Med.* 2009; 122(4 Suppl 1):S24-32.
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2011; 317:666–70
- Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, Leemput J, Bigot K, Campisi L, Abitbol M, Molina T, Charo I, Hume DA, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 2009; 206(3):595-606.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:669–92
- Bala M, Kopp A, Wurm S, Buchler C, Scholmerich J, Schaffler A. Type 2 diabetes and lipoprotein metabolism affect lps-induced cytokine and chemokine release in primary human monocytes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011; 119:370–6.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; 385:640–64
- Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L. The proinflammatory CD14CD16DR monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 2002; 168:3536–3542.

Bevilacqua MP, Nelson RM. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemost.* 1993; 70(1):152-4.

Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009; 117(6):241-250.

Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeyre M, Pattou F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diab Vasc Dis Res.* 2011. [no prelo]

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998; 394(6696):894-7.

Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007; 6(2):137-43.

Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sülthmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer.* 2010; 9:306.

Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:373–379.

Bray GA. How do we get fat? An epidemiologic and metabolic approach. *Clin Dermatol.* 2004; 22(4):281-8.

Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2583-9.

Bronte V e Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5:641–654.

Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery induced weight loss. *Diabetes.* 2005; 54:2277–2286.

Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, Chisholm O, Hofstetter W, Pollard JW, Stanley ER. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development.* 1994; 120(6):1357-72.

Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol.* 1997; 34(4):327-35.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006; 354:610–21.

Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarh D, Mudgett J, Chen H, MacNeil DJ, Reitman ML, Qian S. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res.* 2005; 13(8):1311-20.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27 Suppl 3:S41-5.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IO, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998; 273(40):25573-80.

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Tesch GH. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(6):1711-22.

Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25(10): 823-835.

Cinti S, The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 73(1):9-15.

Clément K. Bariatric surgery, adipose tissue and gut microbiota. *Int J Obes (Lond).* 2011; 35 Suppl 3:

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

Cottam DR, Schaefer PA, Shaftan GW, Velcu L, Angus LD. Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes Surg.* 2002; 12:335-342.

Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(11):722-34.

Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond).* 2005; 29(1):146-50.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010; 33(3):375-86.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes.* 2004; 53:1285-1292

Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AS, Wåhlén K, Andersson J, Nordström EA, Blomqvist L, Sjögren A, Forsgren M, Attersand A, Arner P. A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5834-5840

- Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2011; 32(7):307-14.
- Dalmas E, Rouault C, Abdenmour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, Poitou C. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(2):450-8.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004; 25:4–7.
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation.* 2005; 111:1448 –1454
- D’Haese JG, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14:207–219
- Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(5):812-9.
- Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 2002; 8(9):422-30.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, and Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 11811–11816.
- Esposito K, Pontillo A, Giuliano F, Giuliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giuliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(3):1055-8.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145: 2273.
- Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm.* 2006; 74:443-77.
- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115(5):911-919.
- Fernandez AZ. Peroxisome proliferator-activated receptors in the modulation of the immune/inflammatory response in atherosclerosis. *PPAR Res.* 2008; 2008:285842.
- Ferrante AW Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262:408–414.
- Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6(6):424-31.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993; 82:3170–6

- Flegal KM, Carrol MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA*. 2002; 288(14): 1728-1732.
- Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 1998; 188(8):1413-9.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bra Endocrinol Metabol*. 2006; 50:216-229.
- Forsythe LK, Wallace JM, Livingstone MB. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev*. 2008; 21(2):117-33.
- Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*. 1996; 4:431-43
- Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2011; 117(3):151-64.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:E827-47.
- Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993; 14(10):506-12.
- Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol. Cell Biol*. 2008; 86:398-408
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327: 656-661
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003; 19(1):71-82
- Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD: Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 175:81-92.
- Goerdts S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 1999; 10:137-142.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 23-35.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(12):953-64.
- Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol*. 2001. 69:11-20
- Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes. *Eur. J. Immunol*. 2001; 31:48-56

- Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*. 1992; 80: 1105–1115
- Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001; 226(11):997-1002.
- Handberg A, Norberg M, Stenlund H, Hallmans G, Attermann J, Eriksson JW. J Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. *Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(4):1939-46
- Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(6):2240-7.
- Hauer H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav*. 2004; 83(4):653-8.
- Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1:S143-51.
- Heber D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(1):280S-283S.
- Heimbeck I, Hofer TP, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry A*. 2010; 77A: 823-830.
- Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Kohler H, Girndt M. CD14⁺CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int*. 2008; 73:622– 629.
- Herder C, Haastert B, Muller-Scholze S, Koenig W, Thorand B, Holle R, et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the cooperative health research in the region of augsburg survey S4 (KORA S4). *Diabetes* 2005; 54(Suppl. 2):S11–7.
- Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* 2003; 299: 853–855.
- Huber J, Kiefler FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2008; 93(8):3215-21.
- Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulation expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*. 1996; 87, 2020–2028.
- Hume DA, Macdonald KP. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood*; 2011 [no prelo].
- Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(1):49-53

IBGE. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil Pesquisa de Orçamentos Familiares. 2008-2009

Ingersoll M.A. Spanbroek R. Lottaz C. Gautier E.L. Frankenberger M. Hoffmann R. Lang R. Haniffa M. Collin M. Tacke F. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*. 2010; 115:10–19

Jones KL, Maguire JJ, Davenport AP. Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2011; 162(7):1453-69.

Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD141,CD161 blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2578–2586.

Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M.. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res*. 2011; 89(3):604-13.

Klack K, de Carvalho JF. Dietetic issues in antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int*. 2011 [no prelo].

Keophiphath M, Rouault C, Divoux A, Clément K, Lacasa D. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(1):39-45.

Klintman D, Li X, Thorlacius H. Important role of P-selectin for leukocyte recruitment, hepatocellular injury, and apoptosis in endotoxemic mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11(1):56-62.

Kocic GM, Kocic R, Pavlovic R, Jevtovic-Stoimenov T, Sokolovic D, Nikolic G, Pavlovic V, Stojanovic S, Basic J, Veljkovic A, Pavlovic D, Kamenov B. Possible impact of impaired double-stranded RNA degradation and nitrosative stress on immuno-inflammatory cascade in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009; 117(9):480-5.

Kováčiková M, Sengenés C, Kováčová Z, Siklová-Vítková M, Klimčáková E, Polák J, Rossmeslová L, Bajzová M, Hejnová J, Hněvkovská Z, Bouloumié A, Langin D, Stich V. Dietary intervention-induced weight loss decreases macrophage content in adipose tissue of obese women. *Int J Obes (Lond)*. 2011; 35(1):91-8.

Kriegler M, Perez, C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1998; 53, 45–53.

Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 2007; 13: 803–811.

Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007; 3(12):716-24.

Laimer, M., Ebenbichler, C. F., Kaser, S., Sandhofer, A., Weiss, H., Nehoda, H., Aigner, F., Patsch, J. R. Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 2001; 26,659-662.

- Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009; 113: 963–972
- Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol*. 1999; 162(5):2990-6.
- Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291:H2836–H2846.
- Levine JA, Jensen MD, Eberhardt NL, O'Brien T. Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth. *J Clin Invest*. 1998; 101(8):1557-64.
- Levy RB, Claro RM, Monteiro CA. Sugar and total energy content of household food purchases in Brazil. *Public Health Nutr*. 2009; 12: 2084–91
- Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: Not all monocytes are created equal. *Circulation*. 2008; 117:3168–70.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM: Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998; 12:57–65.
- Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ. Res*. 2007; 101: 335-347.
- Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation*. 2003; 108(20):2498-504.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007; 117(1):175-84.
- Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007 Jan;56(1):16-23.
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*. 2003; 144:2195–2200.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23: 549–555.
- Mathis D, Shoelson SE, Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):81 Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, Mehta NN, Li M, Qu L, Lu Y, Putt ME, Ahima RS, Reilly MP. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(5):1512-8
- McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigenpresenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*. 2005; 17: 8–24.

- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135–45.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997; 91(3):295-8.
- Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Am J Public Health. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003; 2007 (10): 1808-1812.
- Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil *Eur J Clin Nutr*. 1995; 49(2): 105-13.
- Mora, S., Pessin, J. E. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2002; 18,345-356
- Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, Haluzikova D, Horinek A, Matoulek M, Trachta P, Kavalkova P, Svacina S, Haluzik M. The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(4):E606-13.
- Muller WA. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 2001; 194, F47–F51.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007; 204(12):3037-47.
- Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15, 269–275.
- Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14 CD16 monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun*. 1998; 66:2782–2790.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal K.M, Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA*. 2006; 295(13):1549-55.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010 Mar 17; 72:219-46.
- Pandzić Jaksić V, Gizdić B, Miletić Z, Ostović KT, Jaksić O. Monocytes in metabolic disorders--opportunities for flow cytometry contributions. *Coll Antropol*. 2010; 34(1):319-25.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock. HW Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989; 74(7):2527-34
- Patel SR, Hu FB. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16:643–653.
- Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8(1):20-8.
- Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res*. 2002; 10(Suppl 2): 97S-104S.

- Poitou C, Dalmás E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdennour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Clément K, Cremer I. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(10):2322-30.
- Popkin BM. Nutrition in transition: the changing global nutrition challenge. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2001; 10 Suppl: S13-S18.
- Pouane T, Steun K, Bradshaw D, Laubscher R, Fourie J, Lambert V, Mbananga N. Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey. *Obes Res.* 2002; 10(10):1038-1048.
- Prins JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002; 16(4):639-651.
- Prinz N, Clemens N, Strand D, Pütz I, Lorenz M, Daiber A, Stein P, Degreif A, Radsak M, Schild H, Bauer S, von Landenberg P, Lackner KJ. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2011; 118(8):2322-32.
- Rajala MW, Scherer PE. The adipocyte – at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology.* 2003; 144:3765–73
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 1999; 11:753–61.
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 1995; 181, 1857–1862.
- Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J Immunol Methods.* 2003; 278(1-2):283-92.
- Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010; 31:369 –376.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006; 444:847–53.
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol.* 1999; 34(8):959-70.
- Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol.* 2010; 89:2– 4.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(12):7265-70.
- Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, et al. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood.* 2003; 101:1155–63

- Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, Makino H. P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance. *Diabetes*. 2011; 60(1):189-99
- Schäffler A, Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*. 2010; 31(6):228-35.
- Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14CD16 monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- levels. *Thromb Haemost*. 2004; 92:419–424.
- Schön MP, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. 2008 Jan 7;27(2):190-9.
- Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol*. 2010; 11:30.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol*. 2008; 26:421–52.
- Serbina NV, Pamer EG.. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol*. 2006; 7:311–17
- Shah R, Hinkle CC, Ferguson JF, Mehta NN, Li M, Qu L, Lu Y, Putt ME, Ahima RS, Reilly MP. Fractalkine is a novel human adipochemokine associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(5):1512-8.
- Sheu WH, Chang TM, Lee WJ, Ou HC, Wu CM, Tseng LN, Lang HF, Wu CS, Wan CJ, Lee IT. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16:1033–1038.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116(11):3015-25.
- Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24(5): 614-618.
- Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol*. 2008; 67:152–59.
- Smith SA. Central role of the adipocyte in the insulin-sensitizing and cardiovascular risk modifying actions of the thiazolidinediones. *Biochimie* 2003; 85:1219–30.
- Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycl*. 2007; 6(8): 888-894.
- Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol*. 2007; 82:244–52.
- Surmi BK, & Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future lipidology*. 2008; 3(5): 545–556.

- Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 2003; 278(47):46654-60.
- Takahashi H, Tsuda Y, Takeuchi D, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit Care Med.* 2004; 32:1879–1885.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. PPARgamma promotes monocyte/ macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998; 93, 241–252.
- Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev.* 2007; 8(S1):41-4.
- Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60:329–39.
- Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J, Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem.* 2011 May; 117(2):47-56.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92:347–355.
- Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2007; 204:171–80.
- Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010.
- Villagra VG. An obesity/cardiometabolic risk reduction disease management program: a population-based approach. *Am J Med.* 2009; 122(4 Suppl 1):S33-6.
- Volcik KA, Catellier D, Folsom AR, Matijevic N, Wasserman B, Boerwinkle E. SELP and SELPLG genetic variation is associated with cell surface measures of SELP and SELPLG: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Clin Chem.* 2009; 55(6):1076-82.
- Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet.* 2011; 378(9793):815-25.
- Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, Williams LT, Lin H, Stanley ER. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(3):495-505.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr.. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796–1808.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006; 116(1):115-24.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1785-1788.

Wijngaarden S, van Roon JA, Bijlsma JW, van de Winkel JG, Lafeber FP. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:681–688.

Williams MJ. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 2007; 178:4711–16.

Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011; 118(5):e16-31

World Health Organization. Obesity: preventing and managing the Global Epidemic. Report on a WHO Expert Consultation on Obesity, 3-5 June 1997. Geneva; 1997.

World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic World Health Organization Technical Support Series 894 World Health Organization Geneva, Switzerland; 2000.

World Health Organization. Multicentre Forum and Technical Meeting on Population-based Prevention Strategies for Childhood Obesity. Geneva, Switzerland 15-17; 2009.

World Health Organization. Obesity and Overweight. In fact Sheet N°311. Updated March, 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1821-30.

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 2011; 118(12):e50-61.

Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007; 112(2):61-67.

Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011; 1(2):138-149.

Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2000; 67(5):603-606

Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(3):584-92.

Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today.* 1996; 17(9):424-8.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB.. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010; 116(16): 74-80.

Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol.* 1993; 23(9):2053-8.

CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in Obesity and During Weight Loss

Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis

Christine Poitou, Elise Dalmas, Mariana Renovato, Vanessa Benhamo, Froogh Hajduch, Meriem Abdennour, Jean-François Kahn, Nicolas Veyrie, Salwa Rizkalla, Wolf-Hervé Fridman, Catherine Sautès-Fridman, Karine Clément, Isabelle Cremer

Objective—Studies suggest the implication of CD16⁺ subpopulations (CD14⁺CD16⁺, CD14^{dim}CD16⁺) in inflammatory diseases. We aimed to determine the frequency of these subpopulations during weight loss in obesity and diabetes, conditions associated with changes in systemic inflammation, and we tested the link with subclinical atherosclerosis.

Methods and Results—CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ frequencies were measured by flow cytometry in lean subjects, obese subjects before and after a hypocaloric diet or gastric surgery, and obese diabetic subjects before and after gastric surgery. Both monocyte subsets were increased in obese subjects, with a significant enrichment of the CD14^{dim}CD16⁺ subpopulation in obese diabetic patients. Multivariate analysis demonstrated a link between the percentages of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes and glycemia, independent of fat mass. Drastic weight loss led to a sharp decrease of this subset, the variations of which were strongly related to fat mass changes. A reduction of at least 5% of fat mass was sufficient to observe a significant decrease of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes. A diminution of the CD14⁺CD16⁺ subset was also observed during weight loss and was associated with a decrease in intima-media thickness.

Conclusion—This work demonstrates a major impact of fat mass variations on CD14^{dim}CD16⁺ monocyte subsets and that the decrease in the CD14⁺CD16⁺ subpopulation is linked to a reduction of subclinical atherosclerosis.

Clinical Trial Registration—URL: <http://clinicaltrials.gov>. Unique identifier: NCT00476658.

(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2322-2330.)

Key Words: atherosclerosis ■ blood cells ■ diabetes mellitus ■ nutrition ■ obesity

Human obesity is associated with the development of cardiometabolic diseases, such as insulin resistance, dyslipidemia, diabetes, and cardiovascular injury. Obesity is characterized by the modulation of innate immunity. Obese subjects have increased systemic levels of inflammatory markers, such as acute-phase proteins (C-reactive protein [CRP] and serum amyloid A), cytokines, and interleukins.¹ Monocytes have a pivotal role in innate immunity, including phagocytosis, the secretion of inflammatory cytokines, and the production of reactive oxygen species, nitric oxide, and myeloperoxidase. Monocytes are involved in atherogenesis development² and metabolic regulation.³ The monocyte count is positively associated with body mass index (BMI) and triglycerides (TG) and is negatively related to high-density lipoprotein cholesterol.⁴ Furthermore, clinical studies report

that the monocyte count is also associated with subclinical peripheral atherosclerosis⁵⁻⁷ and the development of cardiovascular disease.⁴ Overall, it is proposed that the mononuclear phagocyte system contributes to the pathophysiology of cardiometabolic diseases (review in⁸).

Monocytes display heterogeneous phenotypes characterized by different levels of expression of FcγIII receptors CD16 and CD14.⁹ Classically, the 2 main subpopulations are usually described according to CD16 expression: CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺.¹⁰ These cells display different chemokine-receptor expression profiles, potentially reflecting distinct recruitment properties. The CD14⁺CD16⁻ monocytes express a high level of chemokine (C-C motif) receptor (CCR)-2 (chemokine ligand-2 receptor) and low levels of CCR5 (chemokine ligand-3 receptor) and CX3

Received on: May 9, 2011; final version accepted on: July 7, 2011.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U872, Team 7 Nutriomique and Team 13, Cordeliers Research Center, Paris, France (C.P., E.D., M.R., V.B., F.H., N.V., S.R., W.H.F., C.S.-F., K.C., I.C., M.A.); Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Paris, France (C.P., E.D., M.R., V.B., F.H., N.V., S.R., W.H.F., C.S.-F., K.C., I.C., M.A.); Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, France (C.P., E.D., M.R., V.B., F.H., N.V., S.R., W.H.F., C.S.-F., K.C., I.C.); Nutrition and Endocrinology Department (C.P., K.C.) and Cardiovascular Disease Prevention Unit (J.F.K.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France (4); Centre de Recherche en Nutrition Humaine-Ile de France, Paris, France (C.P., S.R., K.C.); Research and Development Department, Echoscens, Paris, France (M.A.); Surgery Department, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Cochin Hospital, Paris, France (N.V.).

Correspondence to Christine Poitou, INSERM U872, Team 7, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail: bernet@psl.aphp.fr

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.230979

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> by guest on April 8, 2016

chemokine receptor-1 (the fractalkine receptor). On the contrary, the CD16⁺ subpopulation is CCR2 negative but expresses high levels of CX3 chemokine receptor-1 and CCR5 receptors.¹¹ These CD16⁺ cells exhibit a macrophage-like phenotype with enhanced antigen-presenting capacities and higher endothelial affinity, and they are potent producers of proinflammatory cytokines. They express higher levels of tumor necrosis factor- α and major histocompatibility class II and lower levels of interleukin-10, as compared with CD16⁻ monocytes. The CD16⁺ monocyte population is increased in inflammatory situations, such as sepsis, rheumatoid arthritis, and infections.¹¹

A significant increase in the CD16⁺ subset has also been described in human chronic pathologies with low-grade inflammation components, such as in obesity^{12,13} and related cardiovascular diseases.¹⁴ CD16⁺ monocyte frequency is related to intima-media thickness (IMT), a marker of subclinical atherosclerosis^{15,16} in patients with chronic kidney disease characterized by high cardiovascular risk, and in healthy volunteers as well.¹⁷ Based on these observations, it is considered that CD16⁺ monocytes could be cellular players, mediating the pathophysiological relationships between metabolic and cardiovascular diseases.

The cell population of CD16⁺ per se also exhibits phenotype heterogeneity, with 2 described subsets that express either low levels of CD14 (CD14^{dim}CD16⁺) or high levels of CD14 (CD14^{high}CD16⁺). These cell subsets display distinct phenotypic and functional properties.^{18,19} Whether these monocyte subsets show different pathogenic roles in cardiometabolic diseases has not been clearly established. A recent study conducted in 622 healthy volunteers showed that the CD14^{dim}CD16⁺ cell count was correlated with BML.¹³ The same team observed that in patients with chronic kidney diseases, CD14^{high}CD16⁺ monocytes were independently associated with cardiovascular events.¹⁷ Finally, Rothe et al showed that CD14^{dim}CD16⁺ frequency correlated positively with atherogenic lipoproteins and negatively with high-density lipoprotein cholesterol, suggesting a role for this subpopulation in atherogenesis. This cellular population has not been deeply explored in the obesity context or, in particular, in weight loss, a situation well known to be associated with changes in systemic inflammation and in an increase in cardiovascular risk.^{21,22}

In this study, we explored the hypothesis that both the CD14^{dim}CD16⁺ and the CD14^{high}CD16⁺ monocyte subsets could be modulated in obesity and during weight loss and could associate with metabolic phenotypes and subclinical atherosclerosis. Thus, we studied both CD16⁺ subsets in different conditions of obesity and in response to different programs inducing fat mass variations, induced by either diet or surgery. In this latter condition, metabolic and inflammatory parameters and vascular phenotypes obtained in morbidly obese subjects were analyzed in parallel to CD16⁺ monocyte subset frequencies. We demonstrate for the first time a relationship between changes in the CD14^{dim}CD16⁺ subset and reduction of fat mass.

Materials and Methods

Subjects

Three groups of subjects were included in this study. The first population (the obese [OB] and obese diabetic [OB/D] groups)

included 105 obese subjects involved in a gastric surgery program, prospectively recruited between 2008 and 2009 in the Department of Nutrition of Pitié-Salpêtrière Hospital (reference center for the medical and surgical care of obesity, Paris, France). Patients meeting the criteria for obesity surgery included those with a BMI ≥ 40 kg/m² or ≥ 35 kg/m² with at least 1 comorbidity (hypertension, type 2 diabetes, dyslipidemia, or obstructive sleep apnea syndrome). The preoperative evaluation included a detailed medical history and physical, nutritional, metabolic, cardiopulmonary, vascular, and psychological assessments. The weight of the included subjects had been stable (variation of less than ± 2 kg) for at least 3 months before surgery. Subjects did not demonstrate evidence of acute or chronic inflammatory disease, infectious diseases, cancer, or known alcohol consumption (>20 g per day). Patients displaying surgical complications during the first year after surgery were subsequently excluded. They did not take any antiinflammatory drugs. Thirty-eight subjects were classified as having type 2 diabetes by registering a fasting glycemia of greater than 7 mmol/L or by their use of an antidiabetic drug. These 38 subjects (the OB/D group) were treated with metformin and hypolipemic drugs (either fibrates or statins). Nine subjects were also treated with insulin. An oral glucose tolerance test was performed before Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and confirmed that all patients in the nondiabetic obese group (the OB group) had glucose levels of less than 11 mmol/L (200 mg/dL) in the 2 hours following a 75-g oral glucose challenge. Clinical and biological parameters and monocyte subpopulations were assessed before RYGB surgery (n=105) and 3 and 6 months (n=36) after surgery.

A second population (the Diet group) included 39 overweight and moderately obese subjects undergoing a weight loss program (1200 kcal daily over 6 weeks).²³ Clinical and biological parameters and monocyte subpopulations were assessed before diet intervention (n=39) and after 6 weeks of caloric restriction (n=20).

The third population (the control [C] group) included 32 lean, healthy, white volunteers living in the same area as the obese subjects.

Total body fat mass was determined by DXA scanning (GE Lunar Prodigy Corp, Madison, WI). The ethics committee of the Hôtel-Dieu Hospital approved the clinical investigations for both obese and lean individuals. All subjects gave written informed consent. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and was registered in the ClinicalTrials.gov registry.

Metabolic and Inflammatory Parameters

Venous blood samples collected in the fasting state were used to assess lipid, insulin, and glucose values (enabling the determination of insulin-sensitivity parameters) and many others factors, outlined in Poitou et al.²¹ Homeostasis model assessment (HOMA) insulin resistance (IR) was determined using the HOMA Calculator version 2.2.2 (<http://www.dtu.ox.ac.uk/>).²⁴

Carotid and Femoral Artery IMT Measurement

Carotid and femoral B-mode ultrasound imaging was performed using Sequoia 512 ultrasound mainframes (Acuson, Mountain View, CA). A 7-MHz linear array transducer was used for clearly displaying both the blood-intima and media-adventitia boundaries on the far wall of the arteries. The lumen of the arteries was maximized with gain settings to optimize the image quality.

The protocol for measuring carotid IMT (CIMT) consisted of scanning the right and left common carotid arteries longitudinally in the segment 5 to 20 mm proximal to the carotid bulb and on a site free of plaques. Similarly, measurements of femoral IMT (FIMT) were obtained from longitudinal scans of the right and left common femoral arteries in the segment 5 to 20 mm proximal to the bifurcation and on a site free of plaques. IMT measurements were performed offline on a personal computer, and automated edge-detection software (M'ATH, ICN-METRIS) was used to locate the lumen-intima and media-adventitia echographic boundaries. All scans and IMT measurements were performed by a single experienced physician trained in vascular ultrasound, and the intraobserver coefficient of variation for CIMT was $<3\%$.

Table 1. Bioclinical Characteristics in the Different Cohorts: Lean Controls (C), Overweight and Moderately Obese Subjects (Diet), Obese (OB), and Obese Diabetic (OB/D).

	C	Diet	OB	OB/D	Overall <i>P</i> Value
No.	32	39	67	38	
Sex ratio, F/M	25/7	31/8	57/10	26/12	χ^2 NS
Age, y	33.9±1.6 ^{B*}	43.1±1.9 ^C	37.6±1.5 ^B	49.8±1.8 ^A	<10 ⁻⁴
Weight, kg	58.9±1.3 ^C	90.1±2.4 ^B	127.2±2.4 ^A	135.0±3.9 ^A	<10 ⁻⁴
BMI, kg/m ²	21.5±0.2 ^C	32.3±0.6 ^B	46.4±0.9 ^A	48.8±1.3 ^A	<10 ⁻⁴
Fat mass, kg	14.7±1.3 ^C	33.2±1.5 ^B	58.5±1.7 ^A	61.3±2.6 ^A	<10 ⁻⁴
Fat mass, %	25.1±1.9 ^C	38.1±1.2 ^B	46.8±0.6 ^A	46.3±0.9 ^A	<10 ⁻⁴
Glycemia, mmol/L	4.7±0.1 ^B	5.1±0.1 ^B	5.1±0.06 ^B	8.1±0.3 ^A	<10 ⁻⁴
HbA1c, %	ND	ND	5.7±0.04 ^B	7.5±0.3 ^A	ND
Insulinemia, μ U/mL	6.0±0.9 ^C	9.6±0.8 ^C	17.2±1.5 ^B	24.8±3.5 ^A	<10 ⁻⁴
HOMA-IR, %	0.62±0.08 ^C	1.08±0.09 ^C	1.90±0.16 ^B	2.95±0.40 ^A	<10 ⁻⁴
Total cholesterol, mmol/L	4.6±0.2	5.3±0.4	5.0±0.1	4.7±0.1	NS
Triglycerides, mmol/L	1.03±0.10	1.44±0.14 ^{B,C}	1.41±0.08 ^B	2.04±0.15 ^A	<10 ⁻⁴
HDL-c, mmol/L	1.30±0.07 ^B	1.33±0.07 ^B	1.18±0.04 ^A	1.11±0.07 ^A	0.05
Leptin, ng/mL	ND	43.1±3.8	46.3±2.1	39.8±3.7	NS
Adiponectin, μ g/mL	ND	13.7±1.3 ^B	6.8±0.5 ^A	5.8±0.4 ^A	<10 ⁻⁴
CRP, mg/L	2.3±0.4 ^B	4.4±0.7 ^B	10.4±1.0 ^A	8.1±0.9 ^A	<10 ⁻⁴
IL6, pg/mL	ND	ND	3.46±0.22	4.22±0.74	NS

All values are expressed as mean±SEM. Data are expressed as mean±SEM. Overall *P* values were obtained by 1-way ANOVA on log-transformed data adjusted for age. When the ANOVA procedure revealed significant differences, Bonferroni multiple tests were used for post hoc comparisons. BMI indicates body mass index; CRP, C-reactive protein; F, female; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; IL, interleukin; M, male; ND, not determined; NS, nonsignificant data.

*Data not sharing the same letter (A, B, or C) within a horizontal line are significantly different (*P*<0.05).

Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation and Flow Cytometry Analysis

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood by centrifugation on a Ficoll/Hypaque gradient (PAA Laboratories), and were counted by trypan blue exclusion for each patient. Single-cell suspensions were analyzed by 3-color flow cytometry. Cells were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD14 (clone MOP9 from BD Biosciences), phycoerythrin-conjugated anti-CD16 (clone NKP15 from Becton Dickinson), and Alexa Fluor 647-conjugated anti-CCR2 (clone 48607 from Becton Dickinson) or isotypic controls for 20 minutes at 4°C and analyzed with an FACSCalibur cytometer (BD Biosciences). Flow cytometry data were analyzed using Cellquest Pro software (BD Biosciences). Monocyte cells were first gated according to their forward- and side-scatter profiles and then defined as CD14⁺ cells.

Statistics

The normal distribution of the data were tested using the Shapiro-Wilk test. Data were log-transformed when required. Quantitative variables, including clinical and biological parameters as well as monocyte subset percentages, were expressed as mean±SEM values. All analyses were adjusted for age. ANOVA was used to assess the statistical significance of the differences in clinical and biological parameters, as well as in monocyte subsets between the different groups at baseline. When the ANOVA procedure revealed significant differences, Bonferroni multiple tests were used for post hoc comparisons. Relationships between percentages of monocyte subpopulations and continuous variables were assessed by nonparametric Spearman rank correlations. Multiple regression analyses were used to assess the independent associations and contributions of bioclinical variables (age, gender, BMI, fat mass, insulin, glycemia, HOMA-IR, TG, high-density lipoprotein cholesterol, leptin, adiponectin, and high-sensitivity CRP [hsCRP]) at baseline, with CD14^{dim}CD16⁺ or CD14⁺CD16⁺ percentages as the dependent

variables. Multivariate ANOVA was used to explore global variations of the analyzed parameters throughout the follow-up after surgery. Paired Wilcoxon rank sum tests were performed to analyze changes in clinical outcomes and biological marker levels among various time points after surgery. probability values were Bonferroni-corrected. The significance of the strongest dynamic associations involving clinical-biological parameters and CD16⁺ monocyte subset frequencies was further evaluated by building linear mixed-effects (LME) models to test for intervariable redundancies and to adjust for potential confounding factors. All LME models were fit by maximizing the restricted log-likelihood of their estimated coefficients. LME modeling was performed by relying on functions available in the NLME package, with subjects' identification as the random variable. Age, gender, and diabetic status were systematically considered as confounding covariates in the LME models. Statistical analyses were performed using the R program (<http://www.r-project.org>) or JMP Start Statistics (SAS, Cary, NC). A 2-sided significance level was fixed at 5%.

Results

CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocyte Distributions in Obesity and Diabetes

Table 1 presents the bioclinical characteristics of lean subjects (the C group, BMI range 17.6 to 23.8 kg/m²), overweight and moderately obese subjects from the Diet group (BMI range 25.3 to 35.5 kg/m²), obese subjects (the OB group) (BMI range 35.4 to 66.1 kg/m²), and diabetic obese subjects (the OB/D group) (BMI range 35.3 to 68.6 kg/m²) before RYGB. As expected, obese subjects in the Diet, OB, and OB/D groups showed higher fat mass; deterioration of metabolic parameters, such as glucose, insulin, and lipid

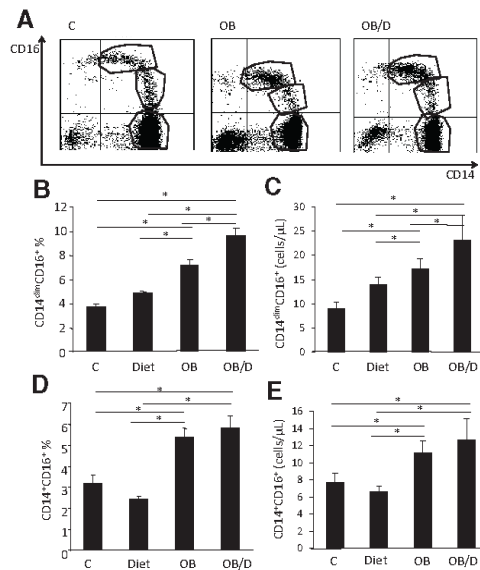


Figure 1. Differences in CD16⁺ monocyte subsets in lean control subjects (C) and obese subjects in the diet (Diet) and surgery (obese [OB] and obese diabetic [OB/D]) groups. A, Representative staining patterns of the expression of CD14 and CD16 in the C, OB, and OB/D groups. B and D, CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocyte subsets frequencies expressed as percentages of total CD14⁺ cells. C and E, CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ absolute monocyte subset counts. All values are expressed as mean \pm SEM. Comparison between groups was performed using a Wilcoxon rank sum test adjusted for age. The Tukey test was used for post hoc comparisons between groups. * $P < 0.05$.

values; and changes in leptin and adiponectin concentrations. The hsCRP levels were significantly higher in obese subjects, in agreement with obesity-associated low-grade inflammation.

The absolute count for peripheral blood mononuclear cells was not different among the 4 groups ($2.94 \times 10^3 \pm 0.96$, $3.14 \times 10^3 \pm 1.20$, $2.96 \times 10^3 \pm 1.01$, and $3.22 \times 10^3 \pm 1.84$ cells/ μ L for the C, Diet, OB, and OB/D groups, respectively). The distribution of CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes was determined by flow cytometry. We observed 2 CD16⁺ monocyte subpopulations, according to CD14, CD16 and CCR2 level expression (Supplemental Figure 1A, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). We confirmed the presence of a first population characterized by a low expression of CD14, high expression of CD16, and no or low expression of CCR2 (CD14^{dim}CD16⁺CCR2⁻) and of a second one characterized by high expression of CD14 and CD16 and moderate expression of CCR2 (CD14⁺CD16⁺CCR2⁺).¹⁹

A representative staining pattern of the surface expression of CD14 and CD16 on monocytes from patients of the C, OB, and OB/D groups is shown in Figure 1A.

Having observed some differences in the mean age of the groups, we adjusted all analyses for age. The mean percentage of CD14^{dim}CD16⁺ was significantly different among the

Table 2. Correlations Between CD16⁺ Monocyte Subpopulations and Bioclinical Data in the Whole Cohort

	CD14 ^{dim} CD16 ⁺		CD14 ⁺ CD16 ⁺	
	<i>r</i>	<i>P</i> Value	<i>r</i>	<i>P</i> Value
Age	0.12	0.02	NS	NS
BMI	0.52	$<10^{-4}$	0.37	$<10^{-4}$
Fat Mass (kg)	0.47	$<10^{-4}$	0.44	$<10^{-4}$
Fat Mass (%)	0.35	$<10^{-4}$	0.35	$<10^{-4}$
Glycemia	0.42	$<10^{-4}$	0.20	0.01
HbA1c*	0.32	8.10^{-4}	0.18	0.05
Insulin	0.45	$<10^{-4}$	0.24	4.10^{-3}
HOMA IR	0.46	$<10^{-4}$	0.24	4.10^{-3}
Triglycerides	0.23	2.10^{-3}	NS	NS
HDL-c	-0.19	0.03	NS	NS
Adiponectin	-0.33	2.10^{-4}	-0.35	$<10^{-4}$
CRP	0.30	5.10^{-4}	0.18	0.04

$n = 166$ subjects. Data show Spearman correlation coefficient. BMI indicates body mass index; CRP, C-reactive protein; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; NS, nonsignificant data.

*HbA1c was only measured in the obese and obese diabetic groups.

4 groups (Figure 1B, $3.7 \pm 0.3\%$, $4.8 \pm 0.2\%$, $7.2 \pm 0.4\%$, and $9.6 \pm 0.6\%$ for the C, Diet, OB, and OB/D groups, respectively, $P < 10^{-4}$). This cell population was 2-fold increased in the OB group compared with lean subjects with significant additional effects of diabetes. Similar findings were observed with absolute counts of CD14^{dim}CD16⁺ (Figure 1C). The mean percentage of CD14⁺CD16⁺ was higher in the OB and OB/D groups, compared with the Diet and C groups, but without additional effects of diabetes (Figure 1D; $3.2 \pm 0.4\%$, $2.4 \pm 0.2\%$, $5.4 \pm 0.4\%$ and $5.8 \pm 0.6\%$ for the C, Diet, OB, and OB/D groups, respectively, $P < 10^{-4}$). Similar findings were observed with absolute counts of CD14⁺CD16⁺ (Figure 1E). Conversely, the mean of CD14⁺CD16⁻ subset was significantly different among the 4 groups, with a decrease of CD14⁺CD16⁻ frequencies in the obese subjects ($93.1 \pm 0.6\%$, $92.8 \pm 0.4\%$, $87.4 \pm 0.6\%$, and $85.0 \pm 1.1\%$, for the C, Diet, OB, and OB/D groups, respectively, $P < 10^{-4}$). Similar findings were observed with absolute counts of CD14⁺CD16⁻. Obesity is thus associated with an increase in both CD16⁺ monocyte subsets, with a selective and significant enrichment of the CD14^{dim}CD16⁺ subset in obese patients with type 2 diabetes.

CD16⁺ Monocyte Subsets and Obesity-Associated Phenotypes

To evaluate the clinical relevance of increased CD16⁺ monocytes, we searched for associations between the CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ subsets and phenotypes related to corpulence and metabolic status in 166 subjects (the C, Diet, OB, and OB/D groups). We found strong associations between CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ subpopulations and parameters of corpulence (BMI, fat mass), glucose tolerance and insulin sensitivity (glycemia, insulin, HOMA-IR), and inflammation markers, such as hsCRP (Table 2). In the Diet, OB, and OB/D groups,

in which adiponectin was measured, high percentages of CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ subpopulations were associated with lower adiponectin concentrations. In the OB and OB/D groups, in which glycosylated hemoglobin (HbA1c) was systematically determined, a positive association was found with monocyte subset frequencies. Furthermore, the percentage of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes was positively correlated with age and TG and negatively with high-density lipoprotein cholesterol (Table 2), unlike the CD14⁺CD16⁺ subset.

In multivariate analysis, taking into account age, gender, BMI, fat mass (kg), HOMA-IR, TG, and glycemia, only BMI (or fat mass) and fasting glycemia were independently associated with the percentage of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes ($\beta=0.11$, $P<10^{-4}$, and $\beta=0.67$, $P<10^{-4}$, respectively). On the other hand, the relationships among CD14⁺CD16⁺ percentage and other quantitative variables (Table 2) were not independent of BMI (or fat mass) because BMI was the only significant regressor determined from multivariate regression analysis ($\beta=0.2$, $P=8.10^{-4}$).

These results strongly suggest that the CD14^{dim}CD16⁺ population is linked to glycemia modifications, an observation not made with the CD14⁺CD16⁺ population, which is mainly linked with corpulence parameters. We further examined the changes of these monocyte subsets in nutritional situations known to modulate fat mass and related changes in inflammatory and metabolic parameters differently.

CD16⁺ Monocytes Subsets and Diet-Induced Weight Changes

The dietary intervention consisted of a hypocaloric diet over 6 weeks, leading to a mean decrease of $5.9\pm 0.6\%$ in body weight and BMI (Supplemental Table I). As anticipated, caloric restriction led to a decrease in fat mass ($-8.3\%\pm 1.3$) and improvement of metabolic parameters, such as circulating insulin, HOMA-IR ($-37.4\%\pm 3.8$), and lipid profile, whereas it had no significant impact on inflammatory parameters (hsCRP and interleukin-6).

Despite significant improvements in fat mass and insulin sensitivity, the dietary challenge was not accompanied by a significant modification of CD16⁺ monocyte populations. Indeed, CD14^{dim}CD16⁺ percentages were $4.3\pm 0.3\%$ and $3.9\pm 0.3\%$, and CD14⁺CD16⁺ percentages were $2.3\pm 0.2\%$ and $2.5\pm 0.3\%$ at baseline and after the dietary intervention, respectively. Similar findings were observed with absolute counts of CD14^{dim}CD16⁺ (14.7 ± 2.9 versus 13.4 ± 1.4 cells/ μ L) and CD14⁺CD16⁺ (6.8 ± 0.8 versus 7.8 ± 2.7 cells/ μ L). However, in 11 of 20 patients, a significant decrease in CD14^{dim}CD16⁺ monocytes could be observed after the diet compared with baseline. To explore the relationships between the kinetic variations of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes and changes in biochemical markers, we performed an LME model ($n=20$). In a multivariate analysis associating age, BMI or fat mass (kg), TG, and glycemia as fixed effects in a combined LME model, we found a positive relationship between the changes in CD14^{dim}CD16⁺ frequencies and the variations in fat mass ($P=0.04$).

CD16⁺ Monocyte Subsets and RYGB-Induced Weight Loss

We further examined the kinetic evolution of CD16⁺ monocyte subsets in 36 obese subjects before and after RYGB. Of these subjects, 15 were diabetic. RYGB resulted in significant decreases in BMI ($-16.8\pm 0.9\%$ and $-23.9\pm 1.2\%$ from baseline at 3 and 6 months, respectively) and in fat mass (kg) ($-19.0\pm 0.9\%$ and $-32.4\pm 1.1\%$ from baseline at 3 and 6 months, respectively) (Table 3). As expected, this RYGB-induced weight loss was associated with major improvements in blood lipids and glucose homeostasis, with a 49% decrease in the insulin resistance surrogate HOMA-IR and a reduction in low-grade inflammation ($-32.9\pm 0.8\%$ diminution of hsCRP) at 3 months. These metabolic and inflammatory changes were also observed in both the OB and OB/D groups when considered separately (Supplemental Figure II).

RYGB-induced weight loss was associated with a drastic reduction of both CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes, with a sharper decrease in CD14^{dim}CD16⁺ 3 months ($-36\pm 4\%$ versus $-17\pm 6\%$ for CD14⁺CD16⁺) (Table 3 and Figure 2A). At 6 months postsurgery, the percentages of both monocyte subsets increased slightly but remained significantly lower than presurgical levels (Figure 2A). The kinetic profiles were similar in the OB and OB/D groups, with a greater decrease at 3 months in OB/D patients (Figure 2B and 2C). Considering the total monocyte counts in whole blood, similar changes in the absolute numbers of CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ were observed (Table 3).

The major improvement in corpulence-related parameters and blood TG was associated with variations in the CD16⁺ subpopulation following RYGB. Through univariate analyses, we observed a positive correlation between BMI, fat mass (kg), and TG changes and variations in the percentages of CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes ($P<0.05$). On the contrary, we found no significant association with blood glucose and insulin-resistance markers. A trend in correlation was only found between CD14^{dim}CD16⁺ and HbA1c ($P=0.09$).

The multivariate models confirmed that variations of monocyte subsets after surgery were mainly related to variations in adiposity and blood lipids but were not independent of glucose tolerance and insulin-sensitivity markers. Indeed, the analysis associating diabetic status, age, gender, BMI (or fat mass [kg]), TG, and HbA1c as fixed effects in a combined LME model confirmed the positive relationship between changes in CD14^{dim}CD16⁺ or CD14⁺CD16⁺ monocyte percentages and changes in BMI (or fat mass) ($P=0.05$) and TG ($P=0.01$).

We examined the individual responses of subjects to RYGB and separated the 36 subjects into 2 groups based on BMI reduction at 6 months after RYGB (Figure 2D). Before surgery, no significant difference was found in anthropometric, metabolic, or inflammatory variables or in the concentrations of serum factors between the 2 groups (data not shown). The subjects with higher weight loss displayed greater decreases in CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ subsets at 6 months (Figure 2E).

Combining values of fat mass variations from the diet and surgery groups, we showed that changes in fat mass were

Table 3. Changes in Bioclinical Characteristics and CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocyte Subpopulations in 36 Subjects Following RYGB

	Preoperative Baseline	3 Mo	6 Mo	Overall <i>P</i> Value
Weight, kg	133.9±4.2	111.6±3.7*	101.9±3.5†	<10 ⁻⁴
BMI, kg/m ²	49.1±1.4	40.9±1.2*	37.3±1.2†	<10 ⁻⁴
Fat mass, kg	61.7±2.6	49.9±2.2*	41.6±2.0†	<10 ⁻⁴
Fat mass, %	47.5±0.7	44.5±0.7*	41.0±0.8* †	<10 ⁻⁴
Glycemia, mmol/L	6.4±0.3	5.6±0.2*	5.1±0.1†	<10 ⁻⁴
HbA1c, %	6.4±0.2	5.9±0.1*	5.8±0.1*	6.10 ⁻⁴
Insulinemia, μU/mL	20.1±2.2	11.6±2.0*	10.7±2.2*	<10 ⁻⁴
HOMA-IR, %	2.32±0.23	1.36±0.23*	1.18±0.24*	2.10 ⁻⁴
Total cholesterol, mmol/L	4.9±0.2	4.4±0.2*	4.2±0.1*	8.10 ⁻⁴
Triglycerides, mmol/L	1.6±0.11	1.4±0.07*	1.2±0.08*	2.10 ⁻³
HDL-c, mmol/L	1.24±0.07	1.17±0.06	1.22±0.06	NS
Leptin, ng/mL	44.1±3.1	24.7±2.3*	21.7±2.3†	<10 ⁻⁴
Adiponectin, μg/mL	5.9±0.4	6.7±0.6	6.3±0.6	NS
CRP, mg/L	10.6±1.5	6.7±1.0*	5.8±1.4*	<10 ⁻⁴
IL6, pg/mL	4.2±0.7	4.7±0.8	3.2±0.4	NS
PBMC, 10 ³ cells/μL	3.0±0.3	2.5±0.3	3.0±0.6	NS
CD14 ^{dim} CD16 ⁺ , %	8.3±0.6	5.0±0.3*	5.3±0.6*	<10 ⁻⁴
CD14 ^{dim} CD16 ⁺ , cells/μL	20.7±2.9	12.4±1.7*	10.9±2.8*	<10 ⁻⁴
CD14 ⁺ CD16 ⁺ , %	5.6±0.8	4.7±0.5*	4.8±0.5*	6.10 ⁻³
CD14 ⁺ CD16 ⁺ , cells/μL	15.1±2.1	10.8±1.7*	7.9±4.2*	3.10 ⁻³

Data are shown as mean±SEM. Overall *P* values were obtained using repeated-measures multivariate ANOVA. Comparisons between preoperative baseline and each time point after gastric surgery were obtained by paired Wilcoxon test. *P* values were Bonferroni corrected. BMI indicates body mass index; CRP, C-reactive protein; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; IL, interleukin; NS, not significant; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass.

**P*<0.050 compared with preoperative value.

†*P*<0.050 compared with 3 mo value.

strongly related to variations in CD14^{dim}CD16⁺ (Figure 3A). Results show that a decrease of at least 5% in fat mass is necessary to observe a significant reduction in the percentages of CD14^{dim}CD16⁺ monocyte subpopulation. However, variations in CD14⁺CD16⁺ subset percentage were not significantly correlated with changes in fat mass (*R*=0.22, *P*=0.1) (Figure 3B).

The results of this series of analysis confirmed the strong dependence between the amount of adiposity reduction and changes in CD16⁺ monocyte subpopulations, as well as the association with blood TG, but they did not show strong evidence of a link with the improvement of glucose metabolism or with insulin sensitivity.

Improvement of Vascular Phenotype Associated With Variation of CD14⁺CD16⁺ Monocytes Subsets During Weight Loss

The data suggested that CD16⁺ monocytes could be important cellular actors in atherosclerosis development.^{14–17,20,25–27}

We evaluated whether a relationship exists between CD16⁺ monocyte subsets and subclinical indicators of early atherosclerosis. We measured FIMT and CIMT in OB and OB/D patients who had never experienced cardiovascular events. No differences in FIMT and CIMT were found between the 2 groups (0.51±0.04 versus 0.54±0.04 mm and

0.63±0.05 versus 0.66±0.05 mm in the OB group versus the OB/D group for FIMT and CIMT, respectively). At baseline, neither CD14^{dim}CD16⁺ nor CD14⁺CD16⁺ percentages were correlated with FIMT or CIMT in the univariate analysis.

We found that age, BMI, fat mass, leptin, and CRP were significantly correlated with FIMT and CIMT in the OB and OB/D groups together (data not shown). In the multivariate analysis, taking into account age, gender, BMI, fat mass (kg), leptin, and CRP, only BMI and fat mass were independently associated with CIMT (*P*=0.02 and *P*=5.10⁻³, respectively, for BMI and fat mass), whereas the only significant relationship with age persisted with FIMT. Thus, in this population of morbidly obese subjects, no statistical link was found between the CD16⁺ monocyte subset and subclinical atherosclerosis.

We further analyzed the variations of subclinical atherosclerosis indicators 3 months after RYGB. Mean FIMT decreased from 0.51±0.01 mm to 0.48±0.01 mm (*P*=0.08), whereas CIMT decreased from 0.62±0.02 to 0.59±0.02 mm (*P*=0.07) at 3 months.

In the univariate analysis, variations in CD14⁺CD16⁺ monocytes were correlated with variations in CIMT (*P*=0.02), with a trend toward a similar relationship with FIMT (*P*=0.08). However, no relationship was found with changes in CD14^{dim}CD16⁺ monocytes. In the multivariate

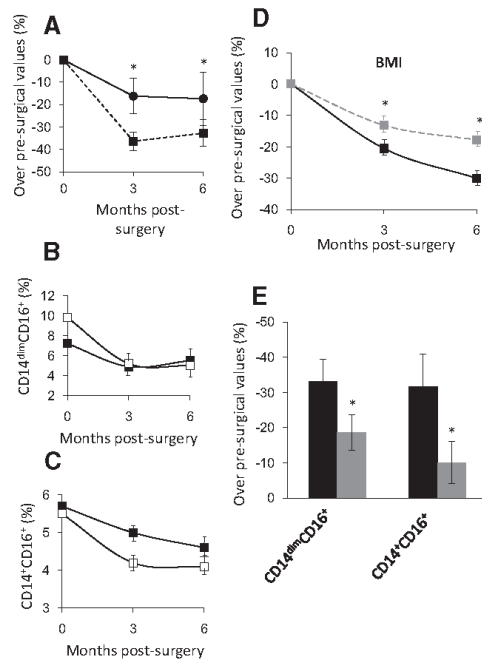


Figure 2. Kinetic variations in monocyte subpopulations CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ at 3 and 6 months following Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and the effect of a distinct amount of BMI reduction on CD16⁺ monocyte subsets at 6 months after RYGB. A, Variations in CD14⁺CD16⁺ (solid line) and in CD14^{dim}CD16⁺ (dotted line) monocyte subpopulations in the whole population in 36 obese subjects. Data are expressed as percentages over presurgical values and are shown as mean±SEM. Comparisons were performed using a Wilcoxon rank test adjusted for age; **P*<0.0002 compared with preoperative values. B and C, Percentages of CD14^{dim}CD16⁺ (B) and CD14⁺CD16⁺ (C) monocytes in 21 obese subjects (solid line) and in 15 obese diabetic subjects (dotted line). Data are expressed as mean±SEM at baseline, 3 months, and 6 months. D Variations in body mass index (BMI) at 3 and 6 months after RYGB are presented for 2 groups of patients defined according to the median (−24.5%) of BMI loss at 6 months. The solid black line represents patients with BMI loss higher than the median (group A), and the dotted gray line represents patients with BMI loss less than the median (group B). E, Changes in monocyte subsets at 6 months in groups A (black bars) and B (gray bars). Data are expressed as percentages over presurgical values and are shown as mean±SEM. Comparisons between groups was performed using a Wilcoxon rank test; **P*<0.05.

analysis, taking into account age, gender, variations in BMI (or fat mass [kg]) and variations in CD16⁺ subsets, the CD14⁺CD16⁺ monocyte count was not independently associated with IMT measurements, confirming a strong dependence with the level of corpulence.

Discussion

In the present study, combining subjects with different levels of corpulence (from moderate to severe obesity) and 2 clinical intervention studies inducing weight loss, we showed strong links between fat mass and the frequencies of

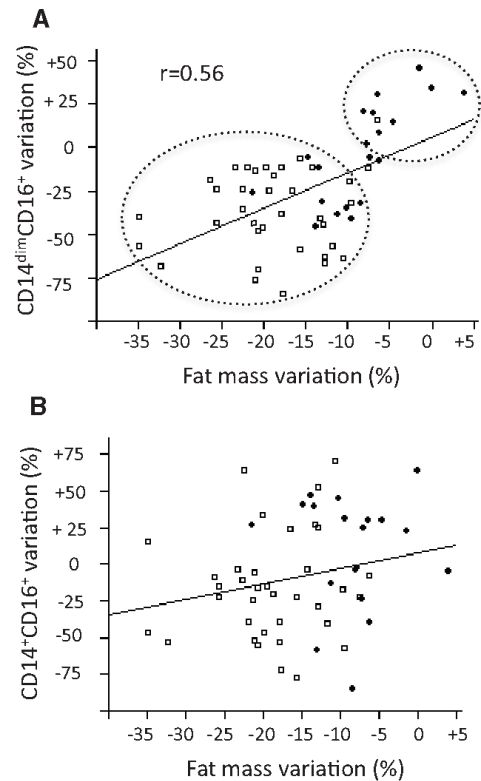


Figure 3. Correlations between percentages of fat mass variation and CD14^{dim}CD16⁺ (A) and CD14⁺CD16⁺ (B) subpopulations during weight loss. Black circles represent values from patients after 6 weeks of diet intervention. White squares represent values from patients 3 months after gastric surgery. The regression coefficient was obtained by a simple linear regression analysis. ANOVA was used to test the significance of regression.

CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in the population. Indeed, we observed an increase of about twice the percentage of CD16⁺ monocyte subsets in obesity and a reduction of these cell populations by drastic fat mass loss. A fat mass decrease of at least 5% was sufficient to observe a reduction in the CD14^{dim}CD16⁺ subpopulation. On the contrary, we could not demonstrate a convincing link with glucose homeostasis in patients involved in clinical trials improving insulin sensitivity. In this context, the only association found with metabolic parameters was with fasting TG.

In healthy humans, 3 monocyte subpopulations have been described (CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺, and CD14^{dim}CD16⁺), differing in phenotype and function.¹⁹ Human obesity is characterized by a significant increase in the CD16⁺ subset.^{12,13} In our study, we demonstrated an increase in the 2 CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocyte subtypes in obese subjects. Furthermore, we also observed that diabetes is associated with an increased frequency of CD14^{dim}CD16⁺ cells, a subtype also

correlated with fasting glycemia. This feature suggests that at least in morbid obesity, increased glycemia could be a parameter regulating CD14^{dim}CD16⁺ population.

Our study raises the question of the association between monocyte phenotypes and insulin-resistance states. We approached this issue using 2 clinical procedures, inducing a moderate change or a more important change in insulin sensitivity, ie, either diet- or surgery-induced weight loss. RYGB is a well-established procedure to reduce body fat mass, to ameliorate metabolic status, and to reduce low-grade inflammation in severe obesity.²² Weight loss also reduces the inflammatory activation of peripheral mononuclear cells in obese subjects.^{28–31} Here, we observed that the percentages of CD16⁺ subsets decreased with surgery-induced weight loss. Patients displaying a higher diminution of fat mass or BMI had greater decreases in CD16⁺ monocyte subsets. A moderate weight reduction (ie, <5%) did not affect monocyte subset frequencies.

Furthermore, we found that a quantitative variation in fat mass during weight loss was strongly correlated with changes in CD14^{dim}CD16⁺ monocytes. It is now well established that the enlarged fat mass characterizing obesity is associated with macrophage accumulation and with alteration of adipose-tissue secretions³², which are also potent modulators of monocyte phenotypes. We have observed a significant correlation between the number of macrophages in visceral adipose tissue and the percentages of CD14^{dim}CD16⁺ monocytes (Dalmas C, Tordjman J, Clement K, Veyrie N, Guerre-Millo M, Poitou C, personal communication), but an extended analysis is required to study the impact of adipose-tissue secretion on monocyte phenotypes in obesity and during weight loss to find the factors involved in the differentiation of CD16⁺ monocytes.

Importantly, although both moderate and drastic weight-loss procedures unambiguously improve insulin-sensitivity surrogates, no kinetic association was found with changes in the percentages of CD16⁺ monocytes. We nevertheless highlighted the association between the frequency of monocyte subsets and TG changes independent of BMI decrease. After RYGB, changes in TG are either related to variations in free fatty acid flux provided from adipose tissue lipolysis or to very-low-density lipoprotein production by the liver in relation to the improvement of insulin resistance. We did not observe any correlation with HOMA-IR or changes in CD16⁺ subsets, suggesting that a decrease in CD16⁺ monocytes could not be attributed to an improvement in insulin resistance. The association between macrophages in human adipose tissue and insulin resistance is also debated. Previous studies have shown a negative correlation between whole-body insulin sensitivity and the expression of the macrophage marker CD68 in subcutaneous adipose depots.^{33,34} Preferential macrophage accumulation into visceral adipose tissue has been observed mainly in subjects with impaired glucose homeostasis,³⁵ and obese subjects with more crown-like structures of macrophages in adipose tissue have been shown to be more insulin-resistant than those subjects lacking these cell aggregates.³⁶ On the contrary and in agreement with this present work on circulating monocytes, no correlation in morbid obesity has been found between adipose tissue mac-

rophages in visceral depots and blood-derived parameters of insulin resistance,^{37,38} whereas an association was found with fasting TG.³⁹ An overfeeding challenge rapidly installed an insulin-resistant state in healthy subjects, despite the fact that no significant change occurred in the total macrophage accumulation in the adipose tissue and that there was no change in the number of circulating cells.⁴⁰ Additionally, we found that irrespective of the degree of insulin resistance in morbid obesity, macrophage accumulation in omental adipose tissue was associated with the severity of liver fibroinflammation, a well-known and severe complication of obesity.³⁸ Although the potential link between adipose tissue macrophages and cardiovascular complications in obesity has not been explored yet, several reports have indicated that there is a link between increases in CD16⁺ monocyte subsets and the development of cardiovascular events^{14–17} and coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris.²⁷ In morbidly obese subjects, we failed to find any relationship between CD16⁺ monocyte subsets and subclinical atherosclerosis evaluated by IMT measurement after adjustment with other risk factors, such as BMI, diabetic status, or lipid parameters. This finding does not exclude that these monocyte subsets might be associated with more advanced stages of cardiovascular disease in obese individuals. However, improvement in IMT after surgery-induced weight loss was associated with a decrease in CD14⁺CD16⁺ monocyte frequency, but this association depended on BMI variation. This observation stimulates the need to explore in depth the relationships between monocyte heterogeneity and the biological events associated with fat mass loss, which is known to reduce cardiovascular risks.

In conclusion, our study highlighted, for the first time, the links between the CD14^{dim}CD16⁺ monocyte subset and fat mass variation and between the CD14⁺CD16⁺ subset and vascular phenotype during weight loss. Further studies are required to characterize the functional properties of CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ subsets and to establish their specific roles in the development of atherosclerosis in obese subjects.

Acknowledgments

We thank Dr Florence Marchelli, Christine Baudouin, and Patricia Ancel (Center for Research on Human Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France), who were involved in patient recruitment, data collection, and sampling at the Center for Research on Human Nutrition, Paris Pitié-Salpêtrière Hospital.

Sources of Funding

We acknowledge financial support from the Centre de Recherche des Cordeliers (Paris) (Young Investigator Fellowship), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Université Paris-Descartes-Paris 5, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and Contrat de Recherche Clinique (CRC P050318 to C.P.). This work was supported by Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (to C.P.), Société Française de Cardiologie (to C.P.), the ANR programs (MicroObes and NUTRA2SENS, to K.C.), European Commission 7th Framework (Collaborative Project ADAPT, contract number HEALTH-F2-2008-201100), and Region Ile de France (CODDIM, to K.C. and F.H.).

Disclosures

None.

References

- Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, Poitou C. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in caloric and carbohydrates intake early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jun 15. [Epub ahead of print].
- Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7:77–86.
- Fernandez-Real JM, Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19:10–16.
- Waterhouse DF, Cahill RA, Sheehan F, McCreery C. Prediction of calculated future cardiovascular disease by monocyte count in an asymptomatic population. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4:177–187.
- Chapman CM, Beilby JP, McQuillan BM, Thompson PL, Hung J. Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2004;35:1619–1624.
- Nasir K, Guallar E, Navas-Acien A, Criqui MH, Lima JA. Relationship of monocyte count and peripheral arterial disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1966–1971.
- Johnsen SH, Fosse E, Joakimsen O, Mathiesen EB, Stensland-Bugge E, Njolstad I, Arnesen E. Monocyte count is a predictor of novel plaque formation: a 7-year follow-up study of 2610 persons without carotid plaque at baseline the Tromsø Study. *Stroke*. 2005;36:715–719.
- Pandzic Jaksic V, Gizdic B, Miletic Z, Ostovic KT, Jaksic O. Monocytes in metabolic disorders—opportunities for flow cytometry contributions. *Coll Antropol*. 2010;34:319–325.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953–964.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74:2527–2534.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81:584–592.
- Cottam DR, Schaefer PA, Shaftan GW, Velcu L, Angus LD. Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes Surg*. 2002;12:335–342.
- Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegler M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girdt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2010;31:369–376.
- Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Doppeide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*. 2004;92:419–424.
- Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun*. 1998;66:2782–2790.
- Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Kohler H, Girdt M. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int*. 2008;73:622–629.
- Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH. CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J*. 2011;32:84–92.
- Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2010;89:2–4.
- Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D’Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010;33:375–386.
- Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1437–1447.
- Forsythe LK, Wallace JM, Livingstone MB. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev*. 2008;21:117–133.
- Poitou C, Coussieu C, Rouault C, Coupaye M, Cancellio R, Bedel JF, Guillon M, Bouillot JL, Oppert JM, Basdevant A, Clément K. Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:309–318.
- Kong LC, Hajdich F, Wuillemin PH, Bastard JP, Fellahi S, Bonnefont-Rousselot D, Bittar JD, Basdevant A, Zucker JD, Doré J, Clément K, Rizkalla S. Plasma insulin and inflammatory markers prior to weight loss can predict dietary responders. *American Diabetes Association’s 71st Scientific Sessions*. San Diego, California; 2010.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004;27:1487–1495.
- Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K, Komukai K, Katawa H, Nakamura N, Hirata K, Tanaka A, Akasaka T. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:130–138.
- Wildgruber M, Lee H, Chudnovskiy A, Yoon TJ, Eitzrodt M, Pittet MJ, Nahrendorf M, Croce K, Libby P, Weissleder R, Swirski FK. Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors. *PLoS One*. 2009;4:e5663.
- Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Ishibashi K, Komukai K, Tanimoto T, Ino Y, Takeshita T, Akasaka T. Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis*. 2010;212:628–635.
- Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004;110:1564–1571.
- Nijhuis J, Rensen SS, Slaats Y, van Dieën FM, Buurman WA, Greve JW. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:2014–2018.
- Sheu WH, Chang TM, Lee WJ, Ou HC, Wu CM, Tseng LN, Lang HF, Wu CS, Wan CJ, Lee IT. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16:1033–1038.
- Kant P, Hull M. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:934; author reply 934–935.
- Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends in Immunology*. 2011;32:307–314.
- Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*. 2005;54:2305–2313.
- Makkonen J, Westerbacka J, Kolak M, Sutinen J, Corner A, Hamsten A, Fisher RM, Yki-Jarvinen H. Increased expression of the macrophage markers and of 11beta-HSD-1 in subcutaneous adipose tissue, but not in cultured monocyte-derived macrophages, is associated with liver fat in human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:1617–1625.
- Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Klötting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2240–2247.
- Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulfloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1654–1659.
- Cancellio R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 2006;113:1141–1147.
- Tordjman J, Poitou C, Hugol D, Bouillot JL, Basdevant A, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clément K. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol*. 2009;51:354–362.
- Cancellio R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54:2277–2286.
- Tam CS, Viardot A, Clément K, Tordjman J, Tonks K, Greenfield JR, Campbell LV, Samocha-Bonet D, Heilbronn LK. Short-term overfeeding may induce peripheral insulin resistance without altering subcutaneous adipose tissue macrophages in humans. *Diabetes*. 2010;59:2164–2170.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in Obesity and During Weight Loss: Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis

Christine Poitou, Elise Dalmás, Mariana Renovato, Vanessa Benhamo, Froogh Hajdouch, Meriem Abdennour, Jean-François Kahn, Nicolas Veyrie, Salwa Rizkalla, Wolf-Hervé Fridman, Catherine Sautès-Fridman, Karine Clément and Isabelle Cremer

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:2322-2330; originally published online July 28, 2011;
doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230979

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2011 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

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

<http://atvb.ahajournals.org/content/31/10/2322>

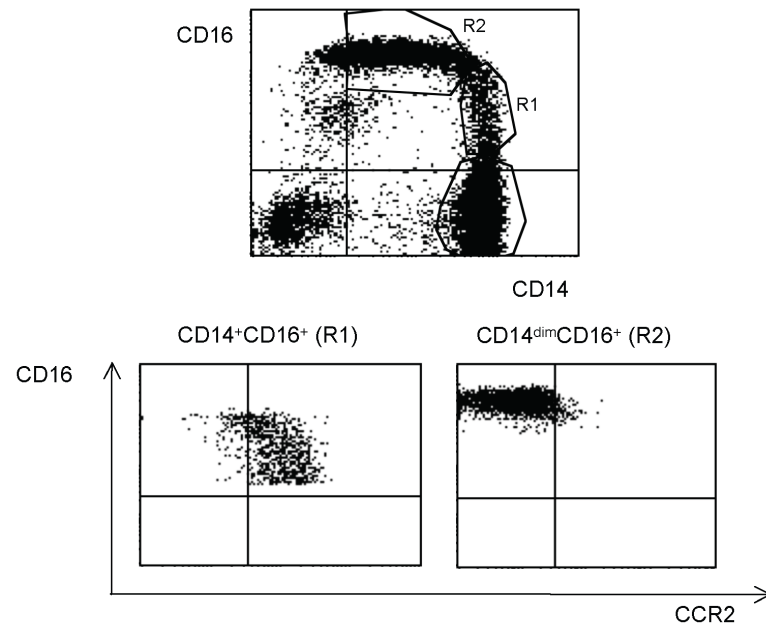
Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/07/28/ATVBAHA.111.230979.DC1.html>

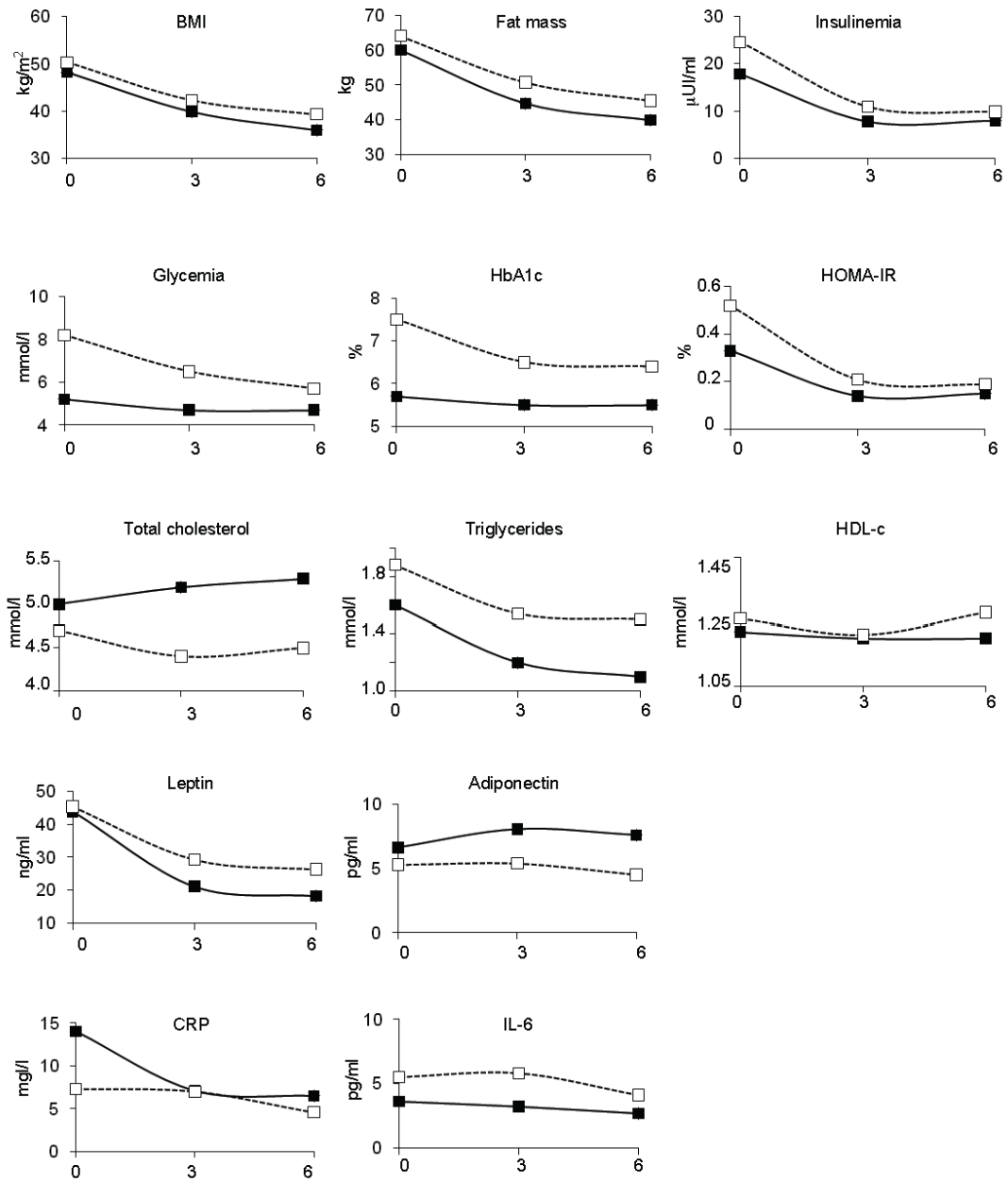
Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the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

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

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



Supplemental Figure I



Supplemental Figure II