UNIRIO - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)

Escola de Medicina e Cirurgia (EMC)

BRENDA SOARES ALVES

IMPACTO DA SÍNDROME METABÓLICA NO PERFIL DE CITOCINA DE CÉLULAS T E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS CIRCULANTES DE ADIPOCINAS

RIO DE JANEIRO

2024

BRENDA SOARES ALVES

IMPACTO DA SÍNDROME METABÓLICA NO PERFIL DE CITOCINA DE CÉLULAS T E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS CIRCULANTES DE ADIPOCINAS

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de médico no Curso de Medicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

Orientador: Cleonice Alves de Melo Bento
Co-orientador: Márcia Helena Costa

RIO DE JANEIRO
2024

BRENDA SOARES ALVES

IMPACTO DA SÍNDROME METABÓLICA NO PERFIL DE CITOCINA DE CÉLULAS T E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS CIRCULANTES DE ADIPOCINAS

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de médico no Curso de Medicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO e aprovado pela banca examinadora

Rio de Janeiro, de de

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Regis Mariano de Andrade- UNIRIO

Prof. Vitor Ribeiro Gomes de Almeida Valviesse- UNIRIO

Prof. Dr Renato Geraldo da Silva Filho- UNIRIO

Dedico este trabalho aos meus pais, Mauro e Bianca. Meus maiores incentivadores, que acreditaram em mim, mesmo quando eu duvidei de mim mesma.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso toda a minha gratidão a Deus, que sonhou para mim sonhos tão lindos e além do que eu poderia imaginar, e me sustentou até aqui com sua fidelidade e amor incondicionais.

Agradeço imensamente aos meus pais, Mauro e Bianca, que sonharam e caminharam ao meu lado em cada passo dessa jornada. Vocês me ensinaram o valor do esforço, perseverança e da honestidade. Obrigada por nunca medirem esforços diante de um sonho que, um dia, já pareceu tão distante. Por serem meu apoio e refúgio ao longo dessa trajetória, compartilhando comigo tanto as dores quanto as alegrias.

À minha irmã, Marianny, agradeço profundamente pela parceria e amizade que nos permitiram enfrentar juntas inúmeras adversidades ao longo deste processo. Compartilhamos não apenas as experiências da minha graduação, mas também as suas próprias jornadas acadêmicas, nas quais estivemos sempre apoiando uma à outra.

Aos meus queridos avós, Nilza e Jair, que com toda sua simplicidade e humildade, nunca deixaram de me apoiar e zelar por mim com todas as ferramentas ao seu alcance.

Aos meus amigos que contribuíram para esta conquista acadêmica, especialmente às preciosas amizades que fiz durante o curso, obrigada por tornarem esses anos mais leves e divertidos. Em especial, agradeço a Rafaela, Cláudio e Raphaela por nossa amizade e cumplicidade, que me ampararam e encorajaram todos esses anos.

À minha orientadora Cleonice, expresso minha gratidão por sua orientação dedicada nesta tese. Foi uma honra ser aluna de uma professora tão extraordinária, cujo conhecimento e incansável dedicação à ciência são uma fonte contínua de inspiração.

E meus sinceros agradecimentos a toda equipe do LIILiT/IB, que se dedica diariamente à ciência, e que com todo seu esforço, permitiram a realização deste trabalho.

"Não é o diploma médico, mas a qualidade humana, o decisivo."

(Carl Jung)

RESUMO

A síndrome metabólica (SMet) é um distúrbio complexo caracterizado pela combinação de obesidade central, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina, aumentando o risco de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. A patogênese da SMet envolve a interação entre fatores genéticos e adquiridos, com destaque para a inflamação crônica de baixo grau. Embora a obesidade visceral tenha sido associada a distúrbios imunológicos no compartimento das células T e na produção de adipocinas, ainda faltam estudos que explorem o impacto da SMet na produção de citocinas por esses linfócitos, principalmente no conhecimento atual sobre a complexa biologia das células T. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de citocinas plasmáticas produzidas por células T no contexto da SMet, e sua relação com os níveis circulantes de leptina e adiponectina. Para tal, foram obtidas amostras de sangue de indivíduos eutróficos (n=7) e de indivíduos obesos, com (n=14) ou sem (n=11) síndrome metabólica, recrutados do serviço de endocrinologia e metabologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. As amostras de sangue periférico foram processadas para obtenção de plasma e células mononucleares. Enquanto os plasmas foram congelados, as células mononucleares foram estimuladas com fitohemaglutinina, um poderoso ativador policlonal de células T, e mantidas em cultura por 3 dias. Os níveis de citocinas foram determinados via Luminex, e as concentrações de leptina e adiponectina por ELISA. Os resultados mostraram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-17) e da citocina anti-inflamatória IL-10 nos plasmas dos indivíduos obesos com ou sem SMet, quando comparado ao grupo eutrófico. Entre os obesos, SMet foi associada a maior produção *in vivo* de TNF-α e IL-5. Quando comparado ao grupo eutrófico, células T obtidas de obesos com ou sem SMet produziram maiores níveis de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-5 e IL-17, associada à menor liberação de IFN-γ e IL-10. De forma interessante, entre os obesos, SMet impactou na maior produção de IL-1β, IL-6, GM-CSF, IL-5 e IL-17 por células T ativadas. Em contraste, menores níveis de IFN-γ foram dosados nos sobrenadantes das culturas de células T do grupo com SMet. Níveis elevados de leptina e baixos de adiponectina foram observados em obesos, principalmente no grupo com SMet. Notavelmente, correlações positivas e significativas entre leptina e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-5, IL-17 e GM-CSF), e correlações negativas entre adiponectina e IL-6 e IL-17 foram observadas, principalmente no grupo com SMet. Em resumo, apesar de preliminares, nossos achados demonstram uma influência significativa da obesidade no perfil de citocina produzido por células T, principalmente entre os indivíduos com SMet. Essa desregulação imune parece envolver distúrbios na produção de adipocinas. Este desequilíbrio imuno-endócrino deve favorecer não apenas o estado inflamatório no qual esses indivíduos estão condicionados, como também deve influenciar negativamente a imunidade adaptativa, promovendo a ativação de células T inflamatórias envolvidas em reações de hipersensibilidade.

Palavras-chave: Síndrome metabólica; Obesidade; Linfócitos T; Citocinas; Adipocinas.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) is a complex disorder characterized by the combination of central obesity, hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance, increasing the risk of cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. The pathogenesis of MetS involves the interaction between genetic and acquired factors, with a notable emphasis on chronic low-grade inflammation. Although visceral obesity has been associated with immunological disturbances in the T cell compartment and adipokine production, there is still a lack of studies exploring the impact of MetS on cytokine production by these lymphocytes, particularly in the context of the current understanding of T cell biology. In this context, the objective of this study was to evaluate the profile of plasma cytokines and cytokines produced by T cells in the setting of MetS, and their relationship with circulating levels of leptin and adiponectin. Blood samples were obtained from eutrophic individuals (n=7) and obese individuals with (n=14) or without (n=11) metabolic syndrome, recruited from the endocrinology and metabolism service of the Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. Peripheral blood samples were processed to obtain plasma and mononuclear cells. While the plasma samples were frozen, the mononuclear cells were stimulated with phytohemagglutinin, a potent polyclonal activator of T cells, and maintained in culture for 3 days. Cytokine levels were determined via Luminex, and leptin and adiponectin concentrations by ELISA. The results showed elevated levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, and IL-17) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the plasma of obese individuals with or without MetS when compared to the eutrophic group. Among obese individuals, MetS was associated with higher in vivo production of TNF-α and IL-5. When compared to the eutrophic group, T cells obtained from obese individuals with or without MetS produced higher levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-5, and IL-17, accompanied by lower release of IFN-γ and IL-10. Notably, among the obese individuals, MetS led to increased production of IL-1β, IL-6, GM-CSF, IL-5, and IL-17 by activated T cells. In contrast, the lowest levels of IFN-γ were detected in the supernatants of T cell cultures from the MetS group. Elevated levels of leptin and low levels of adiponectin were observed in obese individuals, particularly in the MetS group. Notably, positive and significant correlations between leptin and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-5, IL-17, and GM-CSF), and negative correlations between adiponectin and IL-6 and IL-17 were observed, especially in the MetS group. In summary, despite being preliminary, our findings demonstrate a significant influence of obesity on the cytokine profile produced by T cells, particularly among individuals with MetS. This immune dysregulation appears to involve disturbances in adipokine production. This immuno-endocrine imbalance likely not only exacerbates the inflammatory state to which these individuals are predisposed, but also negatively impacts adaptive immunity, promoting the activation of inflammatory T cells involved in hypersensitivity reactions.

Keywords: Metabolic syndrome; Obesity; T-Lymphocytes; Cytokines; Adipokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fenótipos de Células T $CD4^+$……..……18

Figura 2. Alterações nas células imunes em resposta à obesidade no tecido adiposo ……..20

Figura 3. Dosagem de citocinas *in vivo* e *in vitro* em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet……..29

Figura 4. Dosagem de adipocinas plasmáticas em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet……..30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios da IDF para diagnóstico de síndrome metabólica……..……14

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos grupos estudados…..…….……28

Tabela 3. Correlação entre os níveis circulantes de adipocina com os níveis *in vivo* e *in vitro* de citocinas em indivíduos obesos com ou sem SMet……..…….31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - do inglês *antigen presenting cells*

CTL - Linfócitos T citotóxicos

DAC - Doença arterial crônica

DCs - do inglês *dendritic cells*

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

dL - decilitro

ELISA - do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

GATA - do inglês *Trans-acting T-cell-specific transcription factor*

GM-CSF - do inglês *Granulocytes and Macrophage Colony Stimulating Factor*

HDL-C - do inglês *High-density lipoprotein cholesterol*

HUGG - Hospital Universitário Gaffrée e Guinle

IDF - do inglês *International Diabetes Foundation*

IFN-γ - Interferon-Gama

IG - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IMC - Índice de massa corpórea

IRS-I - Substrato 1 do receptor de insulina

iTregs - Linfócito T CD4+ regulador induzido

LEP-R - Receptor de Leptina

M1 - Macrófagos do tipo M1

M2 - Macrófagos do tipo M2

MFI - do inglês *median fluorescence intensity*

MHC - do inglês *Major Histocompatibility Complex*

mL - mililitro

mM - milimolar

NHANES - do inglês *National Health and Nutrition Examination Survey*

NK - do inglês *Natural Killer*

nm - nanômetro

nTreg - Linfócito T $CD4^+$ regulador natural

PBMC - do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PCR - Proteína C reativa

pg - Picograma

RI - Resistência insulínica

RORC - Fator de Transcrição órfão

SMet - Síndrome metabólica

TAB - Tecido adiposo branco

T-bet - do inglês *T-box transcription factor TBX21*

Tc-1 - do inglês *T cytotoxic 1*

TCR - do inglês *T-cell receptors*

TGF-β - do inglês *Transforming Growth Factor Beta*

TFH - Célula T helper folicular

Th - Célula T helper

TNF-α - do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*

Tr-1 - Linfócito T $CD4^+$ regulador do tipo 1

Treg - Linfócito T regulador

µg - micrograma

µL - microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

γ Gama

β Beta

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**.....14
1.1 As células T e seu papel na resposta imune: uma breve revisão……..…...16
1.2 Obesidade e desregulação imune……..……20
2. **OBJETIVO**.....23
2.1 Objetivo Geral.....23
2.2 Objetivos Específicos….....23
3. **METODOLOGIA**.....24
3.1 Pacientes.....24
3.2 Coletas de sangue e obtenção de células mononucleares……24
3.3 Dosagem de citocinas no plasma e no sobrenadante…….....25
3.4 Dosagem de adipocinas no plasma…….....26
3.5 Análise estatística…….....26
4. **RESULTADOS**.....28
4.1 Dados clínicos e demográficos…….28
4.2 Papel da SMet em modular a produção *in vivo* e *in vitro* de citocinas.....28
4.3 Impacto da SMet nos níveis de adipocinas e sua relação no perfil *in vivo* e *in vitro* de citocinas…….....30
4.4 Correlação entre adipocinas e perfil de citocina em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet…….....31
5. **DISCUSSÃO**.....34
6. **CONCLUSÃO**.....39
ANEXO 1.....40
ANEXO 2.....42
REFERÊNCIAS.....45

1. INTRODUÇÃO

A literatura científica tem descrito a síndrome metabólica (SMet) como um distúrbio complexo, definido por um conjunto de fatores interligados que resultam no aumento do risco de doenças cardiovasculares, ateroscleróticas e diabetes mellitus tipo 2 (1). Esta síndrome é caracterizada pela agregação de condições tais como adiposidade, resistência à insulina, meta-inflamação, disfunção endotelial, estado protrombótico, aterosclerose e defesa prejudicada do hospedeiro (2).

Diferentes organizações utilizam variados critérios para identificação da SMet, mas todas as definições baseiam-se em um pilar sólido formado por quatro características principais: obesidade central, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina (RI) (3). Segundo as diretrizes da *International Diabetes Foundation* (IDF) o diagnóstico de SMet depende da apresentação de critérios de circunferência abdominal aumentada (considerando-se características geográficas e étnicas) e pelo menos duas das seguintes condições: colesterol HDL (HDL-C) inferior a 40 mg/dL para homens e 50mg/dL para mulheres; triglicerídeos totais superiores a 150 mg/dL ou em tratamento; glicemia em jejum superior a 100 mg/dL ou em tratamento; pressão sistólica maior que 130 mmHg e diastólica maior que 85 mmHg ou em tratamento (4) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios da IDF para diagnóstico de síndrome metabólica

Circunferência Abdominal	Cintura Abdominal > 94 cm em homens, > 90 cm em homens asiáticos e > 80 cm em mulheres
Glicose plasmática	≥ 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de diabetes
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL ou tratamento para dislipidemia
Colesterol HDL	< 40 mg/dL em homens ou < 50 mg/dL em mulheres ou tratamento para dislipidemia
Pressão Arterial	Pressão sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg ou tratamento para hipertensão arterial

O diagnóstico de SMet pelos critérios da IDF se dá através da medida da circunferência abdominal mais dois outros critérios.

Fonte: Adaptado pelo autor a partir de Saklayen (2018).

A SMet está frequentemente ligada à obesidade e, muitas vezes, também associada ao diabetes tipo 2 (4). A presença de SMet aumenta em cinco vezes o risco de desenvolver diabetes tipo 2, duplica o risco de doenças cardiovasculares e eleva de duas a quatro vezes a probabilidade de ocorrerem acidentes vasculares cerebrais, infartos do miocárdio e mortes relacionadas a esses eventos, em comparação com indivíduos sem a síndrome (5). De acordo com o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), em uma análise feita na população americana, indivíduos obesos têm uma incidência doze vezes maior de síndrome metabólica, quando comparados com indivíduos de peso normal (6). Apesar disso, a relação entre excesso de gordura e SMet nem sempre é estreita, dito que existem indivíduos considerados obesos metabolicamente saudáveis, que apresentam níveis normais de sensibilidade insulínica, e não possuem alterações metabólicas características da síndrome (4). Devido a maior dificuldade de mensuração, não há no momento números globais sobre a SMet, entretanto estudos sugerem que essa condição seja cerca de 3 vezes mais comum que a diabetes, permitindo uma estimativa de que mais de 25% da população mundial seja afetada, contabilizado mais de um bilhão de pessoas em escala global (4).

A patogênese da SMet resulta da interação entre fatores genéticos e adquiridos, marcados pela resistência à insulina e inflamação crônica de baixo grau (7). Estilos de vida pouco saudáveis, como uma dieta rica em calorias e pobre em fibras, além do sedentarismo, são reconhecidos como contribuintes significativos para o desenvolvimento da síndrome (4; 7). Acredita-se que a presença de componentes inflamatórios no tecido adiposo faça com que a obesidade influencie o desenvolvimento de doenças inflamatórias, metabólicas e outras condições de saúde associadas (8). Portanto, indivíduos obesos apresentam um tecido adiposo mais inflamado e uma desregulação do sistema imunológico, com aumento dos níveis circulantes de proteínas e citocinas pró-inflamatórias, mantendo uma inflamação crônica de baixo grau (9). Na fisiopatologia da doença, o tecido adiposo branco (TAB) é o principal depósito de gordura e atua como o maior órgão endócrino ao secretar adipocinas e citocinas sistemicamente (10). Embora haja uma escassez de estudos focados exclusivamente na síndrome metabólica, várias evidências associam a expansão do TAB ao mecanismo fisiopatológico central da síndrome

(11). Ainda, a hipertrofia do TAB impacta na qualidade da resposta imune por alterar a funcionalidade das células do sistema imune, particularmente das células T.

1.1 As células T e seu papel na resposta imune: uma breve revisão

O Sistema Imune é classicamente conhecido por sua atuação na defesa do hospedeiro, identificando e eliminando potenciais ameaças externas, os patógenos. Para tal, ele é composto por diversos elementos humorais e celulares que atuam de maneira coordenada para restaurar a homeostase do organismo. Os componentes celulares são classicamente separados em dois compartimentos principais: a imunidade inata, responsável pela resposta imediata e estereotipada contra diferentes agentes infecciosos, e a imunidade adaptativa, que atua em fase mais tardia, porém apresenta especificidade e respostas de maior amplitude, direcionadas a diferentes patógenos. Os linfócitos T são componentes do compartimento adaptativo, podendo ser subdivididos em dois grupos: os linfócitos T $CD4^+$ e os linfócitos T $CD8^+$ (12; 13).

A ativação das células T dirigida contra diferentes peptídeos antigênicos durante uma resposta imune primária depende de células apresentadoras de antígenos (APC) imunogênicas, particularmente das células dendríticas (DCs) profissionais. As DCs também possuem papel essencial na diferenciação desses linfócitos em variados fenótipos efetores, que apresentarão funcionalidade diferenciada contra determinados patógenos (14; 15)

Os linfócitos T, diferentemente das células da imunidade inata, expressam um repertório extremamente amplo de receptores chamados de TCRs (do inglês *T-cell receptors*), sendo capazes de reconhecer milhões de diferentes peptídeos. Consequentemente, cada linfócito T expressa TCR único, capacitando-os a reconhecer especificamente sequências primárias de aminoácidos (epítopos) em um peptídeo antigênico (16). A ativação e diferenciação dessas células durante a resposta imune primária depende do reconhecimento de 3 sinais em conjunto à DC madura. O primeiro é caracterizado pela apresentação de peptídeos pelas DCs para células T $CD4^+$ ou $CD8^+$ antígeno-específicas, através das moléculas de MHC II e I, respectivamente. O segundo sinal, antígeno-independente, é mediado pela interação de B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressos nas DCs, com o receptor CD28, expresso nos linfócitos T. Esses dois sinais são fundamentais para ativar a linfoproliferação

(17). O terceiro sinal, responsável por induzir a diferenciação, será fornecido pelas citocinas produzidas pela DC durante a sinapse imunológica com a célula T, permitindo a formação de diferentes fenótipos efetores, em especial no compartimento das células T $CD4^+$, como representado na figura 1 (18).

A diferenciação das células T CD4+ em diversos fenótipos depende da ativação de fatores de transcrição capazes de alterar, de forma estável, o transcriptoma desses linfócitos em resposta às citocinas liberadas pelas DCs (Fig. 1). Nesse contexto, sob a ação da citocina IL-12 secretada pelas DCs, o fator transcricional T-bet é induzido, e as células T se diferenciarão no fenótipo T auxiliar do tipo 1 (Th1) (19; 20). O fenótipo Th1 secreta grandes quantidades de IFN-γ e IL-2, realizando a resposta imune celular que é fundamental no combate a microrganismos intracelulares obrigatórios ou facultativos, por aumentar a função dos macrófagos M1, das células NK e dos linfócitos T $CD8^+$. O IFN-γ em associação a IL-21, ambas citocinas secretadas pelas células T *helper* foliculares 1 ($T_{FH}1$), também induzem a produção e secreção de IgG1 (Imunoglobulina G do tipo 1) e IgG3 (Imunoglobulina G do tipo 3) pelos linfócitos B humanos (21; 22).

Na presença de níveis elevados de IL-4 produzidos pelas DCs, os linfócitos T $CD4^+$ diferenciam-se em células T auxiliares do tipo 2 (Th2), através da indução do fator de transcrição GATA-3 (20). Esses linfócitos, principalmente o subtipo $T_{FH}2$, ao secretarem IL-4, IL-5 e IL-13 (22), induzem a produção e secreção de anticorpos da classe IgE que participam da resposta imune envolvida no combate às infestações por helmintos e nas reações de hipersensibilidade do tipo I por induzir a degranulação de mastócitos e eosinófilos (20; 23).

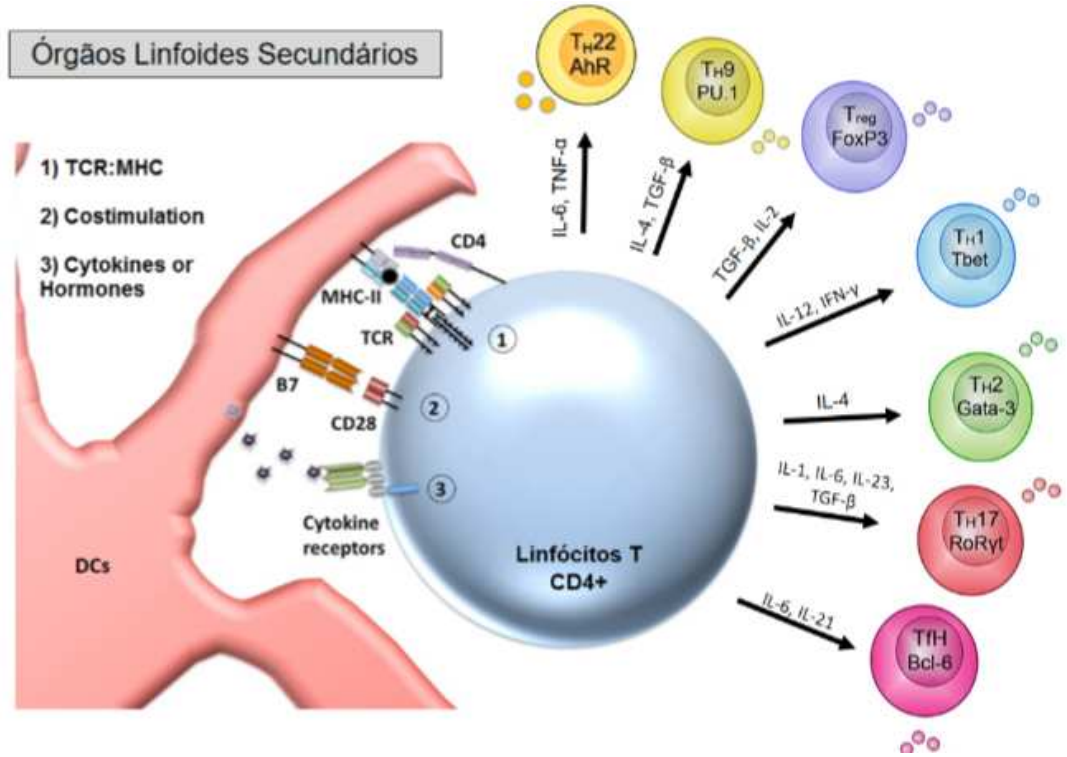


Figura 1. Fenótipos de Células T CD4+: Durante o processo natural de ativação da resposta imune específica mediada pelas células T CD4+, as células dendríticas (DCs) apresentam diferentes peptídeos de proteínas antigênicas no contexto das moléculas do MHC de classe II. Durante essa sinapse imunológica, moléculas co-estimuladoras expressas na superfície das DCs, particularmente CD80 e CD86, interagem com o marcador CD28 expresso nas células T CD4+, permitindo, assim, a indução de diferentes vias de sinalização que culminam na proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas. Os diferentes fenótipos são caracterizados por expressarem diferentes fatores de transcrição.

Fonte: Golubovskaya & Wu (2016); O'Donnell & Mcsorley (2014); Russ et al (2013).
Adaptado por Bento, CAM

A ativação do fator de transcrição RORc tem sido implicada na indução do fenótipo Th17, induzido pela ação conjunta do TGF-β (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*), IL-1β e IL-6 pelas DCs (24; 25). No entanto, a estabilização desse fenótipo celular é dependente da IL-23 liberada pelas DCs (26). Os linfócitos Th17 quando ativados sintetizam IL-17, sua citocina de assinatura. A IL-17 tem como principal função induzir as células imunes e parenquimatosas a secretarem IL-8, principal quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (20; 27). Subtipos de células Th17 foliculares ($T_{FH}17$), por produzirem elevados níveis de IL-21 e IL-17, também auxiliam na ativação de plasmoblastos

produtores de IgA e IgG (22; 28). Entretanto, na ausência de TGF-β, IL-1β, IL-6 e IL-23 induzem subtipos de células Th17 patogênicas implicadas em reações de hipersensibilidade (29; 30).

Os linfócitos T $CD8^+$ são particularmente importantes no combate aos vírus. A ativação dessas células depende da apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do MHC de classe I expressos na superfície das APCs profissionais, particularmente das DCs. Classicamente, quando ativadas, essas células se tornam linfócitos T citotóxicos (CTL), passando a produzir granzimas e perforinas que juntas atuam na eliminação das células infectadas, por apoptose (31). Assim como os linfócitos T $CD4^+$, essas células são capazes de se diferenciar em fenótipos efetores distintos, secretando diferentes padrões de citocinas. Por produzirem altas concentrações de IFN-γ, as células T $CD8^+$ são capazes também de amplificar a resposta Th1, sendo, por isso, também chamadas de Tc-1 (do inglês *T cytotoxic 1*) (32; 33).

As respostas imunes necessitam ser reguladas, pois, caso contrário, podem favorecer o desenvolvimento de doenças imunomediadas (34). Nesse contexto, os linfócitos T reguladores (Tregs), sendo a maioria do tipo células T $CD4^+$, são as células mais importantes na manutenção da homeostase por controlar as respostas inflamatórias (35). Qualquer deficiência na função ou no número dessas células pode elevar o risco de desordens imunológicas, tais como doenças autoimunes e alérgicas. Os linfócitos Tregs são formados por diversas subpopulações, os linfócitos T $CD4^+$ reguladores do tipo 1 (Tr-1) e os linfócitos T CD4+ reguladores naturais (nTreg) e induzidos (iTregs) (35; 36). Apesar das células nTreg e iTegs serem fenotipicamente idênticas, a primeira é gerada no timo e exerce funções de autocontrole, evitando doenças autoimunes. Por outro lado, as iTregs são induzidas na periferia por DCs tolerogênicas e macrófagos M2, ambos subtipos celulares capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias. Essas células T reguladoras podem utilizar diferentes mecanismos para suprimir a proliferação e a função dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ efetores, tal como a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (35; 37). Distúrbios funcionais nesses linfócitos têm sido associados a reações de hipersensibilidade, e devem contribuir para o estado de meta-inflamação associado à obesidade.

1.2 Obesidade e desregulação imune

Em indivíduos eutróficos, a maioria das células imunes do TAB é composta por macrófagos do tipo M2 e poucas células T, sendo a maioria do tipo células T $CD4^+$ reguladoras (38; 39). Na vigência de obesidade, a proporção dessas células locais diminui e um aumento na fração de macrófagos do tipo M1 e de células T $CD4^+$ efetoras é observado (39; 40). As células M1 são ricas fontes de citocinas inflamatórias, particularmente, IL-12, IL-1β, IL-6, TNF-α e a IL-23, associadas à resistência insulínica (41; 42). De forma sistêmica, o estado inflamatório nos obesos é identificado pela presença de níveis plasmáticos aumentados de IL-8, IL-6, proteína C-reativa (PCR) e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (40; 41). Quanto aos fenótipos de células T circulantes, a obesidade tem sido associada a uma alteração no equilíbrio entre diferentes subtipos de células T $CD4^+$, com preferencial expansão de células Th17, e ativação anormal das células T $CD8^+$ (43). Além disso, o tecido adiposo também se relaciona com uma menor porcentagem de células Tregs no sangue periférico (40; 44). Todas essas alterações no compartimento das células T devem envolver, ao menos em parte, desequilíbrio na produção de adipocinas, particularmente a adiponectina e leptina.

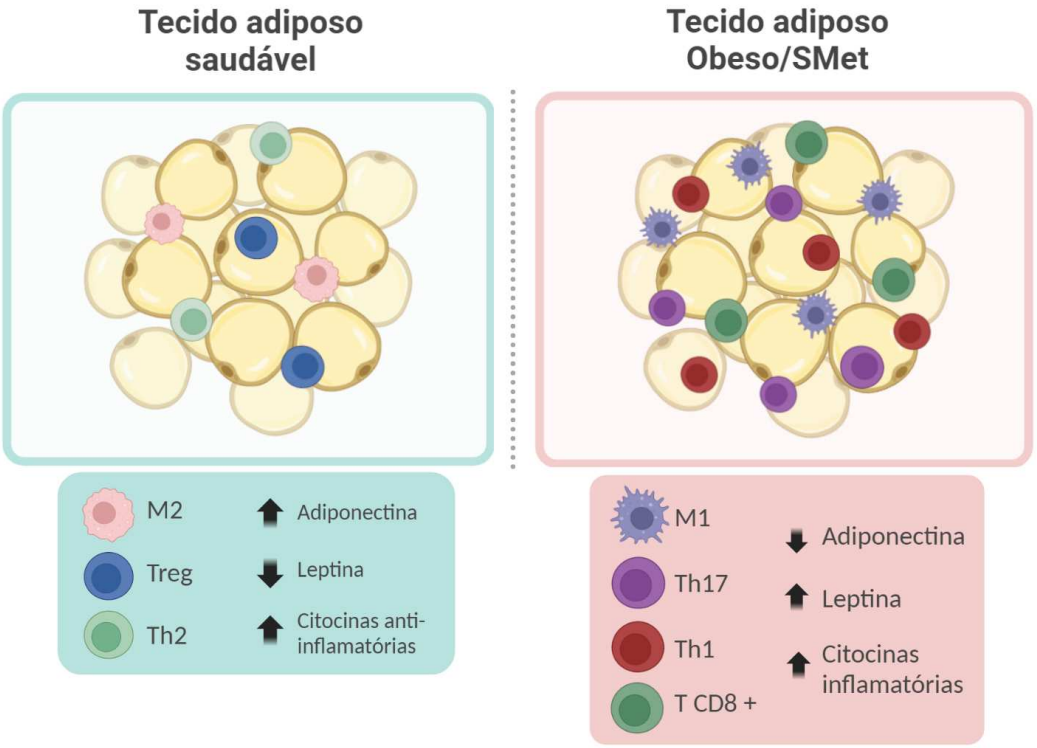


Figura 2. Alterações nas células imunes em resposta à obesidade no tecido adiposo. O tecido adiposo magro é caracterizado pela homeostasia dos níveis de adipocinas, assim como um ambiente rico em citocinas pró inflamatórias e dominado por macrófagos M2, células Th2 e Tregs. A expansão do tecido adiposo na obesidade/SMet estabelece um desequilíbrio nos níveis de adipocinas, caracteristicamente com hiperleptinemia e hipoadiponectinemia que determinam um influxo aumentado de macrófagos M1 pró-inflamatórios e uma alteração do perfil de diferenciação de células T com predomínio de Th17/Th1, além de maior recrutamento de T CD8+ e uma redução do compartimento de Tregs.

As adipocinas exercem um papel fundamental na regulação do apetite e do gasto energético, além de influenciarem a sensibilidade à insulina, a capacidade oxidativa e a captação de lipídios na periferia (5). No entanto, o perfil das adipocinas varia em resposta à quantidade e ao estado do tecido adiposo. A adiponectina é encontrada em grandes quantidades no sangue periférico, secretada exclusivamente pelo tecido adiposo, e produzida principalmente em adipócitos brancos e marrons (3; 45). Reconhecida por suas propriedades antiaterogênicas, anti-inflamatórias e antidiabéticas, a adiponectina é fundamental para a modulação de processos metabólicos essenciais, como o metabolismo da glicose e a oxidação de ácidos graxos (3; 7). Ela atua como sensibilizador endógeno da insulina e por isso desempenha um papel essencial na manutenção da sensibilidade celular à insulina (42; 45). A adiponectina é capaz de inibir a ativação de macrófagos M1 e promover a proliferação do subtipo M2, o que reflete nas suas propriedades anti-inflamatórias (42; 46). Essa adipocina inibe a produção de citocinas inflamatórias, induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (45), e favorece a expansão de células Tregs (42; 47). Paradoxalmente, embora produzida exclusivamente pelo tecido adiposo, os níveis de adiponectina diminuem com o aumento do IMC, e consequentemente, com a proliferação do TAB (5). Essa correlação negativa com a obesidade se explica pelo fato de que os níveis elevados de TNF-α e IL-6 suprimem a transcrição da adiponectina na linhagem celular dos adipócitos (45).

Diferente da adiponectina, a leptina exerce efeitos essencialmente pró-inflamatórios no sistema imune, e tem um papel fundamental na regulação do peso corporal e do gasto energético através de um feedback negativo com vias de sinalização hipotalâmicas (5; 11). A produção de leptina é proporcional a hipertrofia e hiperplasia do TAB, sendo assim, a obesidade está associada a altas concentrações circulantes de leptina concomitantemente com a redução da sinalização do receptor

de leptina (48). Tendo em vista a atividade pró inflamatória dessa adipocina, a hiperleptinemia pode contribuir para o estado inflamatório crônico da obesidade (49). Na imunidade inata, a leptina é capaz de aumentar a produção de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12 por macrófagos e monócitos (49), assim como estimular a quimiotaxia de neutrófilos e a produção de espécies reativas de oxigênio por essas células (45). Na imunidade adaptativa, doses fisiológicas dessa adipocina aumentam a produção de IFN-γ pelas células Th1 e favorece a transformação de macrófagos M0, e M2, em M1 (50). Além disso, a leptina atua na diferenciação de subconjuntos de células T CD4+ regula positivamente as células Th1 e Th17 enquanto inibe a proliferação de Tregs (51). Apesar dessas alterações terem sido observadas em pacientes obesos, faltam estudos similares no cenário da SMet.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da SMet no perfil de citocina plasmática e de citocinas produzidas pelas células T e sua correlação com as adipocinas leptina e adiponectina.

2.2 Objetivos específicos

- Dosar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no plasma de indivíduos eutróficos (controle) e obesos com e sem SMet.
- Quantificar citocinas pró-inflamatórias relacionadas aos fenótipos de células T do tipo Th1, Th2 e Th17, assim como de células T reguladoras, produzidas por células T obtidas de indivíduos eutróficos (controle) e obesos com e sem SMet.
- Correlacionar os níveis *in vivo* e *in vitro* das citocinas com as concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina nos diferentes grupos experimentais.

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes

Para o presente estudo indivíduos eutróficos (n=07) e obesos sem (n=11) e com (n=14) síndrome metabólica (SMet) foram recrutados do serviço de endocrinologia e metabologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG). O critério de obesidade foi determinado pelo índice de massa corpórea (IMC) maior ou superior a 30, que é calculado a partir da divisão do peso (em Kg) pelo quadrado da altura (em metros). Para a SMet, foi adotado o critério da IDF, que dispõe que os indivíduos devem apresentar circunferência abdominal maior que 80 cm em mulheres e 94 cm em homens, além de, pelo menos, dois dos seguintes fatores: pressão arterial maior que 130/85 mmHg ou em tratamento para hipertensão arterial; triglicerídeo maior que 150 mg/dL ou tratamento para dislipidemia; HDL-C menor que 40 mg/dL para mulheres e 50 mg/dL para homens ou tratamento para dislipidemia; e glicemia superior a 100 mg/dL ou em tratamento. Esses pacientes foram recrutados no ambulatório de doenças metabólicas do HUGG sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Helena Costa. Foram excluídos pacientes tabagistas, com neoplasias, que possuíam doenças autoimunes, que estavam em uso de anti-inflamatório/antibiótico na última semana, imunodeprimidos e pacientes gestantes e lactantes. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HUGG (ANEXO 1) e as amostras dos indivíduos só foram coletadas após a obtenção do consentimento oral e escrito, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2)

3.2 Coleta de sangue e obtenção de células mononucleares

Aproximadamente 20 mL de sangue periférico foram coletados de cada indivíduo em tubo com heparina e imediatamente encaminhados para o LIILiT/IB, para obtenção do plasma e de células mononucleares, através da centrifugação em gradiente de Ficoll-PAQUE PLUS.

O plasma foi obtido a partir da centrifugação do tubo de sangue, aliquotados em microtubos, num volume de 1 mL por tubo, e congelados para posterior quantificação de citocinas e adipocinas. As células mononucleares do sangue

periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas após centrifugação do sangue total, previamente diluído em solução de Hank (1:1, v/v), em gradiente de densidade Ficoll-PAQUE PLUS (Cytiva). Através do uso de azul de trypan e câmara de Neubauer, a suspensão de PBMC viáveis foi ajustada (1 × 106/mL) e cultivada em microplacas de fundo plano de 24 poços com 1 mL Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (ThermoFisher Scientific Inc.) suplementado com 2 mM de L-glutamona, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 20 U/mL de penicilina, 20 µg/mL de estreptomicina e 20 mM do tampão HEPES (GIBCO, Carlsbad, CA, USA). Para ativar as células T, as culturas de PBMC foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA, 1 µg/mL) por 3 dias, numa estufa à temperatura ambiente e 5% de CO2. Após o término da cultura, o sobrenadante de todos os poços foi coletado, adicionado em microtubos de 2 mL e armazenado a -70ºC para posterior quantificação de citocinas.

3.3 Dosagem de citocinas no plasma e no sobrenadante

Os níveis de diferentes citocinas circulantes e no sobrenadante das culturas foram determinados via Luminex usando o kit “Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 18-plex human Panel” (InvitroGen, San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 50 µL do mix das beads, sensibilizadas com diferentes anticorpos anti-citocinas, foram adicionadas aos poços. Em seguida, foram adicionadas 25 µL das amostras (diluída 1:2) e dos controles em cada poço. A placa foi incubada durante 2 horas e, após esse tempo, 25 µL do mix de anticorpos de detecção biotinilados foram adicionados em cada poço e incubados por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados aos poços 50 µL da streptavidina-PE, seguido de uma incubação de 30 min a temperatura. Entre as etapas, foram realizadas lavagens para remover o conteúdo que não se ligou aos anticorpos. Finalmente, 120 µL do tampão de leitura foram adicionados aos poços, seguido de agitação por 5 min. Os dados foram adquiridos no Luminex 200, usando o sistema xMAP. Os resultados são expressos de acordo com a média de intensidade de fluorescência (MFI – do inglês *median fluorescence intensity*) e transformados em pg/mL a partir de uma curva-padrão.

3.4 Dosagem de adipocinas no plasma

As concentrações plasmáticas de leptina e adiponectina foram realizadas por meio da técnica de ELISA, utilizando os kits Leptin ELISA (BD, Pharmingen, San Diego, CA) e Adiponectin ELISA (BD, Pharmingen, San Diego,CA)" respectivamente, seguindo todas as orientações do fabricante. Brevemente, as amostras foram diluídas 1:2500, e 50 µL do plasma previamente diluído foi adicionado a cada poço contendo anticorpo primário anti-leptina ou anti-adiponectina (anticorpo de captura). A placa foi incubada durante 2 horas e, após esse tempo, 100 µL do anticorpo secundário anti-leptina ou anti-adiponectina (previamente tratado com a enzima horseradish peroxidase conjugada a estreptavidina) foram adicionados em cada poço e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos depois, após a adição de uma solução de parada [ácido fosfórico a (1,0 mol L-1)]. As placas foram lidas a 620 nm em um leitor de ELISA (DynexTechnologies, USA). Leptina e adiponectina recombinantes, variando de 0-1000 pg/mL e 0-15 ng/mL respectivamente, foram usadas para construir curvas-padrão.

3.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 9.0 para Windows (GraphPad). Para determinação da normalidade das amostras, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado. Para determinar se duas variáveis, com distribuição não normal, foram estatisticamente diferentes para cada variável dada, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O teste t de Student foi aplicado para verificar se uma determinada variável, com distribuição normal, foi estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. Para análise de uma variável em três grupos, foi realizado o teste Anova de uma via, sendo, por fim, realizado o pós-teste de Tukey para identificar a significância entre os grupos, quando de distribuição normal, e o pós-teste de Dunn, quando de distribuição não normal. As correlações entre variáveis paramétricas e não paramétricas foram investigadas por meio das correlações de Pearson e

Spearman, respectivamente. Os valores foram considerados significativos quando $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados clínicos e demográficos

No presente estudo, amostras de sangue periférico foram colhidas de 32 indivíduos que foram divididos em eutróficos (n=7) e obesos sem (n=11) ou com diagnóstico fechado de síndrome metabólica (SMet, n=14) (Tabela 2). Nenhuma diferença foi observada entre o IMC e a média de idade entre obesos com ou sem SMet (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos grupos estudados

	Indivíduos		
	Controle[a]	Controle[b]	SMet[c]
Nº de indivíduos (n)	07	11	14
Gênero feminino/masculino (n)	6/1	8/3	10/4
Idade [(anos), média ± DP] [d]	29,5 ± 5,5	34,5 ± 10,4	41,42 ± 6,1
IMC (média) [e]	23,7 ± 3,7	41,3 ± 10.2	40,9 ± 7,7

Dados de indivíduos eutróficos[a] e obesos sem SMet[b] ou com SMet[c]. [d]Idade no momento da coleta das amostras de sangue foram colhidas. [e]Índice de massa corporal do paciente no momento da consulta.

4.2 Papel da síndrome metabólica em modular a produção *in vivo* e *in vitro* de citocinas

Classicamente, tanto a obesidade quanto a SMet têm sido associados à elevação nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a IL-1β, a IL-6 e o TNF-α (52). No presente estudo, e em acordo aos achados obtidos por outros pesquisadores (53; 54), níveis significativamente mais elevados de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17, GM-CSF e de IL-10 nos plasmas dos obesos, com ou sem SMet, foram observados se comparado ao grupo controle (indivíduos eutróficos) (Fig. 3A). Adicionalmente, a quantidade de IFN-y e de IL-5 *in vivo* foram significativamente menores nos grupos controle quando comparada aos indivíduos com SMet. Entre os indivíduos obesos, a ocorrência de SMet foi associada à maior produção sistêmica das citocinas TNF-α, IL-5 e IL-17 (Fig. 3A).

Sabendo que os níveis dessas citocinas circulantes podem ser produzidos por diferentes células, tais como por células T ativadas, nosso próximo passo foi quantificar os níveis dessas citocinas a partir do sobrenadante de culturas de PBMC contendo células T policlonalmente ativadas. Como demonstrado na figura 3B, maiores níveis de IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-5 e IL-13 foram produzidos por células T de indivíduos obesos com ou sem SMet quando comparado ao grupo eutrófico (Fig. 3B). Adicionalmente, a produção de GM-CSF e de IL-17 pelas células T do grupo com SMet foi maior que nas culturas de células dos indivíduos eutróficos (Fig. 3B). Em contraste, a dosagem de IFN-y e de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células de indivíduos eutróficos foi superior à observada nos obesos com ou sem SMet (Fig. 3B). Finalmente, quando comparamos os dois subgrupos de indivíduos obesos, a ocorrência de SMet favorece maior produção de IL-1β, IL-6, GM-CSF, IL-5 e IL-17 e menor secreção de IFN-y (Fig. 3B).

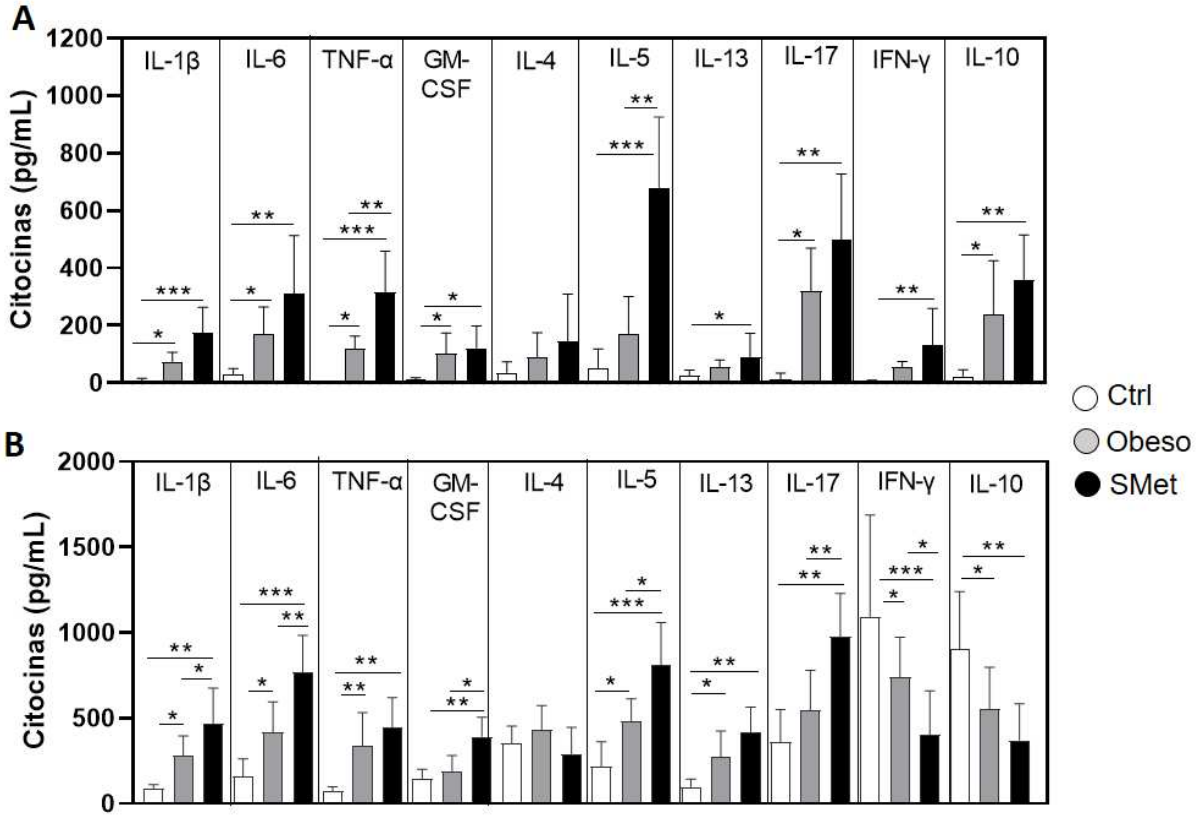


Figura 3. Dosagem de citocinas *in vivo* e *in vitro* em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet. A dosagem de citocinas nos plasmas (**A**) e nos sobrenadantes (**B**) de culturas de PBMC (1 x 10^6/mL) contendo células T ativadas por 3 dias com PHA (1µg/mL) foi realizada por Multiplex. Os dados apresentados são de indivíduos eutróficos (Ctrl, n=7) e obesos sem (n=11) ou com (n=14)

SMet. Os valores médios ± dp foram comparados entre os três grupos via ANOVA, sendo a diferença considerada significante com (*) p<0,05, (**) p<0.001 e (***) p<0.0001.

4.3 Impacto da SMet nos níveis de adipocinas e sua relação no perfil *in vivo* e *in vitro* de citocinas

Estudos demonstram que tanto a obesidade quanto a SMet impactam na produção de adipocinas, e muitas delas têm função imunomoduladora direta ou indireta sobre as células do sistema imune inato e adaptativo (55; 56). Nesse sentido, nosso próximo objetivo foi avaliar os níveis circulantes de leptina e adiponectina em indivíduos eutróficos e obesos sem ou com SMet. Como pode ser observada na figura 4A, maiores níveis de leptina foram dosados entre os obesos, com ou sem SMet, quando comparado ao grupo controle, sem diferença entre os dois subgrupos de obesos. Quanto à adiponectina, o contrário foi observado, com maiores níveis dessa adipocina sendo dosados nas amostras de plasmas do grupo controle (Fig. 4B). Ainda, entre os obesos, o valor médio de adiponectina foi significativamente menor no grupo com SMet (Fig. 4B).

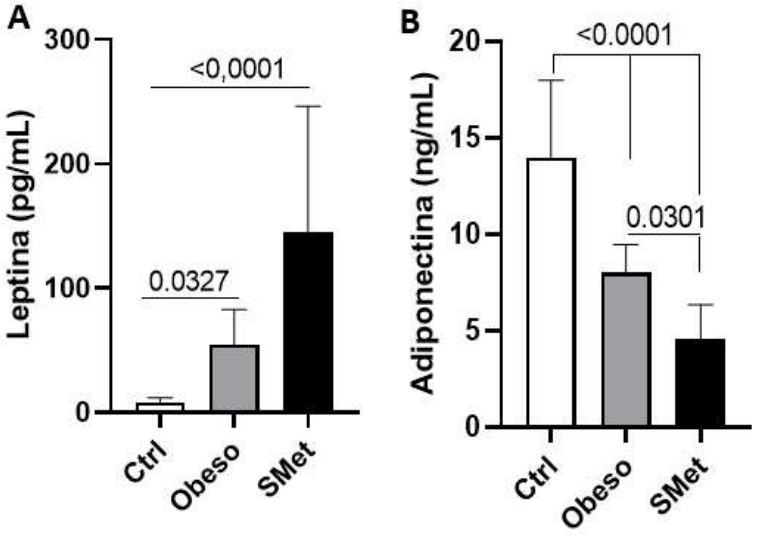


Figura 4. Dosagem de adipocinas plasmáticas em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet. A dosagem de leptina (**A**) e adiponectina (**B**) foi avaliada nos plasmas de indivíduos eutróficos (n=7, Ctrl) e obesos sem (n=11) ou com (n=14) SMet através da técnica ELISA. Os valores médios ± dp foram comparados entre os três grupos via ANOVA, sendo a diferença considerada significante com p<0,05.

4.4 Correlação entre adipocinas e perfil de citocina *in vivo* e *in vitro* em indivíduos eutróficos e obesos com ou sem SMet

Embora estudemos os sistemas e seus componentes separados, *in vivo*, há uma complexa interação entre eles em condições fisiológicas e patológicas. Por exemplo, a obesidade tem sido associada à gravidade de reações de hipersensibilidade mediadas por células T efetoras (57). O mecanismo por trás dessa associação adversa pode envolver desregulação na produção de adipocinas, tais como leptina e adiponectina (58). No presente estudo, ao correlacionarmos os níveis circulantes de adipocinas com o perfil plasmático de citocinas, nós observamos uma correlação positiva e significativa entre os níveis de leptina com a dosagem plasmática de IL-1β (p= 0.0415) em obesos e de IL-6 (p= 0,0366), IL-5 (p= 0,0408) e IL-17 (p= 0,0407) nos indivíduos com SMet (Tabela 3). Por outro lado, uma correlação negativa e significativa foi observada entre a adiponectina e os níveis circulantes de IL-6 (p= 0,0418) (Tabela 3). Como a dosagem de citocinas plasmáticas no grupo controle foi abaixo do limite de detecção na grande maioria dos indivíduos, não foi possível realizar as mesmas análises de correlação no presente estudo.

Quanto à produção de citocinas pelas células T, uma correlação direta foi observada entre a dosagem de IL-6 (p= 0.0371) e IL-17 (p= 0.0411) com os níveis plasmáticos de leptina em obesos. A mesma correlação foi observada entre os níveis desta adipocina com a produção de IL-6 (p= 0,0172), GM-CSF (p= 0.0471), IL-5 (p= 0,034) e IL-17 (p= 0.0047) pelas células T de indivíduos do grupo com SMet (Tabela 3). Por outro lado, a adiponectina correlacionou-se negativamente com a produção *in vitro* de IL-6 [obeso (p= 0,0181) e SMet (p= 0.0398)] e IL-17 [obeso (p= 0.0364) e SMet (p= 0,0440) em ambos os subgrupos de obesos. No grupo controle, nenhuma correlação foi observada entre as adipocinas e a produção de diferentes citocinas *in vitro* (dados não mostrados).

Tabela 3. Correlação entre os níveis circulantes de adipocina com os níveis *in vivo* e *in vitro* de citocinas em indivíduos obesos com ou sem SMet.

Citocinas *in vivo* (pg/mL) x Leptina (pg/mL)	Obeso		SMet	
	r	p	r	p
IL-1β	**0,4952**	**0.0415**	0,4611	0,1066
IL-6	0,4399	0.0576	**0,6068**	**0,0366**
TNF-α	0,3918	0,1012	0,4105	0,1762
GM-CSF	0,2781	0,4050	0,1211	0,8121
IL-4	0,1009	0,6513	0,2373	0,7451
IL-5	0,3811	0,1015	**0,5419**	**0,0408**
IL-13	0,1981	0,5077	0,1267	0,7971
IL-17	0,4419	0,0511	**0, 6019**	**0,0407**
*IFN-*y	0,2753	0,4266	0,1441	0,7514
IL-10	0,3081	0,2022	0,3678	0,2651

Citocinas *in vivo* (pg/mL) x adiponectina (ng/mL)	Obeso		SMet	
	r	p	r	p
IL-1β	-0,1211	0,7871	-0,4012	0,1148
IL-6	-0,3012	0,5181	**-0,5881**	**0,0418**
TNF-α	-0,2451	0,4763	-0,2105	0,6056
GM-CSF	0,1982	0,7232	-0,2172	0,6012
IL-4	0,099	0,8173	0,1725	0,7176
IL-5	0,1057	0,7645	-0,3304	0,3098
IL-13	-0,1451	0,7443	-0,1011	0,7455
IL-17	-0,2017	0,5781	-0,4052	0,1087
*IFN-*y	-0,1091	0,7561	-0,2821	0,7583
IL-10	0,2983	0,5534	0,1091	0,3144

Citocinas *in vitro* (pg/mL) x leptina	Obeso		SMet	
	r	p	r	p

IL-1β	0,3952	0.1449	0,4439	0,0974
IL-6	**0,5699**	**0.0371**	**0,7068**	**0,0172**
TNF-α	0,4733	0,0748	0,4295	0,1101
GM-CSF	0,2249	0,4203	**0,5775**	**0,0471**
IL-4	0,1761	0,5533	0,2758	0,6118
IL-5	0,3181	0,2056	**0,5956**	**0,034**
IL-13	0,0922	0,8098	0,1019	0,8876
IL-17	**0,4871**	**0,0411**	**0, 8323**	**0,0047**
IFN-y	0,4117	0,2672	0,3011	0,4811
IL-10	0,3019	0,4098	0,3494	0,2987

Citocinas *in vitro* (pg/mL) x adiponectina (ng/mL)	Obeso		SMet	
	r	p	r	p
IL-1β	-0,1871	0,5012	-0,3331	0,5012
IL-6	**-0,5998**	**0.0181**	**-0,5871**	**0.0398**
TNF-α	-0.1181	0, 6171	-0,3665	0,4988
GM-CSF	0,1091	0,6519	0,3672	0,4761
IL-4	0,1009	0,7361	0,2142	0,6019
IL-5	0,1081	0,6727	-0,4861	0,0817
IL-13	0,1554	0,5871	0,1232	0,7190
IL-17	**-0,5460**	**0.0364**	**-0,5288**	**0.0440**
IFN-y	0,1909	0,5312	0,2561	0,5562
IL-10	0,4118	0,1018	0,2347	0,5918

Correlação entre níveis plasmáticos de leptina (pg/mL) e adiponectina (ng/mL), avaliados por ELISA, com citocinas plasmáticas (*in vivo*) e produzidas por células T (*in vitro*), quantificadas por Multiplex, de indivíduos eutróficos (n=7) e obesos com (n=14) ou sem (n=11) SMet.

5. DISCUSSÃO

A SMet é uma condição clínica complexa e multifatorial, caracterizada por uma combinação de fatores de risco que aumentam a probabilidade de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (1; 6; 7). A obesidade, em particular, é um componente central da SMet, contribuindo significativamente para o desenvolvimento e progressão desta condição (9). Nossos dados demográficos revelaram uma maior proporção de mulheres em ambos os grupos de obesos. Esses achados estão alinhados com a literatura, que frequentemente observa uma maior prevalência de obesidade e SMet entre mulheres em diversos contextos epidemiológicos (59; 60). A média de idade dos participantes obesos foi de 34,5 anos (DP ± 10,4), enquanto a média de idade dos obesos com SMet foi de 41,12 anos (DP ± 6,1). Apesar do tamanho reduzido da amostra, a diferença de idade entre os grupos, ainda que pequena, pode refletir o aumento da prevalência de SMet com a idade, um fenômeno documentado em estudos prévios (6). Além disso, não houve diferença significativa no IMC entre os grupos de obesos, o que sugere que esse componente, por si só, não é suficiente para diferenciar os estados metabólicos dos indivíduos, e atua apenas como um indicador geral de obesidade. Este achado se justifica pois a distribuição da gordura corporal pode diferir entre indivíduos com o mesmo IMC, sendo a gordura visceral a mais associada com a SMet (61).

Biomarcadores inflamatórios têm sido implicados na etiologia e progressão de distúrbios metabólicos. Várias citocinas pró e anti-inflamatórias têm sido associadas à SMet e seus componentes (62). Nossos achados, apesar de preliminares, demonstraram que o diagnóstico de SMet em vigência de obesidade altera o perfil *in vivo* e *in vitro* de citocinas, principalmente quando correlacionadas às células T, sendo muitos desses desequilíbrios associados à produção de adipocinas. O tecido adiposo branco é um órgão endócrino biologicamente ativo que secreta várias substâncias, como adipocinas, citocinas e quimiocinas (56). As alterações geradas pela obesidade nesse microambiente determinam a infiltração de diferentes tipos de células imunes, liberação de citocinas e alteração do perfil de subtipos celulares, que culminam com diversas alterações metabólicas.

No contexto das citocinas, nossos resultados revelaram dados interessantes com níveis plasmáticos significativamente elevados de IL-1β, IL-6 e TNF-α em

indivíduos obesos, independente da presença de SMet. Essas citocinas regulam substancialmente o balanço energético e o metabolismo de lipídios e carboidratos, e têm sido intimamente associadas com a SMet e seus mecanismos (62). O TNF-α é uma citocina inflamatória secretada pelo tecido adiposo visceral, conhecida por interferir no metabolismo energético nos adipócitos, levando a alterações na metabolização de glicose e lipídios, e na sinalização insulínica (62; 63). Através da capacidade do TNF-α de fosforilar resíduos de serina no IRS-I (Substrato 1 do receptor de insulina) e uma consequente diminuição da atividade da tirosina quinase do receptor de insulina, ele pode determinar a resistência à insulina (54). No que diz respeito à IL-6, concentrações elevadas desta citocina têm sido associadas a pacientes com anormalidades lipídicas e resistência à insulina (54). Estudos indicam que até 30% da IL-6 na corrente sanguínea é secretada pelo tecido adiposo, e seus níveis apresentam correlação positiva com o IMC (64). A produção de IL-1β pelos adipócitos e macrófagos dentro do TAB contribui para o processo de inflamação, e a ação combinada de IL-1β e TNF-α estimula as células musculares lisas a produzirem IL-6 (65). Além disso, após sua liberação, a IL-1β contribui para o dano às células endoteliais e outras complicações cardiovasculares do diabetes (66). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias observados em indivíduos com SMet sugerem uma possível aplicação terapêutica de inibidores de citocinas. Por exemplo, o bloqueio do TNF-α com antagonistas do TNF (como infliximabe ou adalimumabe) mostrou reduzir a inflamação e melhorar a resistência à insulina em pacientes com doenças inflamatórias crônicas (67). Além disso, inibidores de IL-6 (como tocilizumabe) têm sido explorados para reduzir a inflamação sistêmica e melhorar os marcadores metabólicos em indivíduos com obesidade e SMet (68; 69). O anticorpo monoclonal anti-IL-1β também parece melhorar a apoptose das células β pancreáticas, com aumento de sua proliferação e preservação, acompanhado de melhora da sensibilidade à insulina (70).

A expansão do tecido adiposo na obesidade causa uma alteração fenotípica significativa no perfil de células imunológicas, especialmente nas células T (71; 72). Feuerer et al. (2011) demonstraram que camundongos obesos apresentam uma maior proporção de células T $CD8^+$ e um aumento notável no número de células Th1, juntamente com uma diminuição significativa na fração de células Th2, em comparação com camundongos magros (73). Estudos em modelos humanos

revelaram que PBMCs de pacientes com obesidade e diabetes tipo 2 apresentaram um aumento no número de células Th17 (74; 75). Em nosso estudo, observamos que ambos os grupos de indivíduos obesos apresentaram maior produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17, como IL-6, TNF-α, GM-CSF e IL-17. Em particular, a produção de GM-CSF e IL-17 foi mais elevada nas culturas de células T dos indivíduos com síndrome metabólica, enquanto a produção de IL-10 foi superior nas culturas de células dos indivíduos eutróficos. Tendo em vista o papel anti-inflamatório das Tregs no tecido adiposo por meio da secreção de IL-10 (73), nossos dados corroboram com trabalhos que evidenciaram um número reduzido de células Tregs no TAB de pacientes obesos, assim como uma correlação negativa desses níveis com o IMC (76). A redução dos níveis de IL-10 em indivíduos com SMet pode indicar um desequilíbrio no mecanismo anti-inflamatório natural. Terapias que aumentam a produção ou a ação de IL-10 estão sendo investigadas para restaurar esse equilíbrio e reduzir a inflamação crônica associada à obesidade e SMet. Estratégias como a administração de IL-10 recombinante (77) ou o uso de moduladores de Tregs que aumentam a produção de IL-10 têm mostrado potencial em estudos pré-clínicos (78).

Os níveis elevados de IL-6 nas amostras in vitro também parecem estar associados com alterações importantes no perfil de diferenciação dessas células T. A ausência dessa citocina impulsiona as células T CD4 + virgens em direção à diferenciação em células Tregs, enquanto sua presença promove a diferenciação em células Th17 (79). Nossos dados também demonstraram a presença de níveis elevados de IL-5 em obesos, achados que se mostram contra intuitivos à luz da literatura que indica um perfil fenotípico predominantemente Th1 nesses indivíduos. A obesidade resulta em uma maior ativação e recrutamento de eosinófilos no tecido adiposo (80), e essas células podem atuar como fonte alternativa de IL-5, o que justificaria os níveis *in vivo* e *in vitro* dessa citocina em obesos. Em camundongos, análise por microscopia de fluorescência demonstrou que eosinófilos interagem diretamente com células T $CD4^+$ antígeno-específicas em linfonodos (81), favorecendo tanto resposta imune mediada por células Th2, por secretar IL-4 e IL-5, quanto fenótipo Th1, por produzir IL-12 (82).

O grau de desregulação na resposta imune também tem sido associado a mudanças na produção de determinadas adipocinas, particularmente leptina e

adiponectina (11). Assim como bem fundamentado na literatura, nossos resultados mostraram níveis elevados de leptina em obesos de todos os grupos, enquanto a adiponectina estava reduzida nesses indivíduos e com um valor médio significativamente menor no grupo com SMet. Estas adipocinas secretadas pelos adipócitos não apenas contribuem para a inflamação localizada no tecido adiposo branco (83), mas também podem induzir um aumento sistêmico de citocinas responsáveis pela resistência periférica à insulina (84). Resultados *in vivo* e *in vitro* mostraram uma correlação positiva da leptina com diversas citocinas pró inflamatórias nos grupos de obesos. A leptina é conhecida por estimular a produção de TNF-α e IL-6 ativando monócitos e macrófagos (85). Essa adipocina também participa na diferenciação de células T através de uma supressão de citocinas de Th2 e um favorecimento do perfil Th1 e Th17 (86). Estudos anteriores mostraram que o receptor de leptina (LEP-R) é expresso em células T $CD4^+$ e é capaz de alterar as respostas imunes para um fenótipo Th1 (60). Além disso, a via da leptina pode atuar como um sinal negativo para a proliferação de células Treg (87).

Ao contrário da leptina, a adiponectina é uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias e seus níveis elevados estão associados a um risco reduzido de doença arterial coronariana (DAC) (88) e a melhores desfechos cardiovasculares (89). Estudos clínicos implicam a hipoadiponectinemia no desenvolvimento de diferentes componentes associados a SMet como DM2 (90; 91) e hipertensão (92; 93). Além disso, níveis circulantes aumentados de adiponectina correlacionam-se positivamente com o colesterol HDL sérico (94; 95). Quando relacionamos a adiponectina com as citocinas, ela demonstrou uma relação inversa com IL-6 plasmática e com IL-17 *in vitro*. A adiponectina regula negativamente a secreção de TNF-α, que por sua vez, determina secreção de IL-6 (96). Em contraste, o TNF-α e a IL-6 inibem a expressão do gene da adiponectina e sua secreção a partir de adipócitos (97; 98). Firouzjaei at al (2016) mostraram que em pacientes diabéticos, o efeito de melhoria da metformina na proporção adiponectina/leptina foi concomitante com a redução nas citocinas inflamatórias IL-6 e TNF-α (99). Estudos anteriores também demonstraram uma relação positiva entre IL-17 e hipoadiponectinemia, favorecendo um perfil Th17, em diferentes modelos experimentais (100; 101; 102). Além disso, a adiponectina tem sido identificada como um regulador da polarização

de macrófagos, suprimindo o fenótipo M1 e estimulando a expressão do subtipo M2, o que contribui para a redução da inflamação (103).

6. CONCLUSÃO

A Síndrome Metabólica (SMet) emerge como uma condição clínica multifatorial, interligando obesidade, resistência à insulina, meta-inflamação e outros fatores que culminam em um risco aumentado de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. No presente estudo, verificamos que a obesidade, independentemente da presença de SMet, está associada a um perfil pró-inflamatório caracterizado por níveis elevados de citocinas como IL-1β, IL-6 e TNF-α.

A disfunção imunológica associada à obesidade e SMet é corroborada pela alteração no perfil das células T, evidenciada pelo aumento na produção de citocinas inflamatórias pelas células T ativadas. Nossos dados destacam um desequilíbrio no microambiente imunológico, com uma redução significativa nas células Th1 e Tregs, associado a um aumento nas células Th17 e Th2, evidenciando um estado inflamatório crônico.

O papel das adipocinas, particularmente a leptina e a adiponectina, é crucial na modulação da resposta inflamatória. Observamos que a leptina, cujos níveis estão elevados em indivíduos obesos, correlaciona-se positivamente com citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a manutenção da inflamação crônica. Em contraste, a adiponectina, que apresenta níveis reduzidos na obesidade, especialmente em casos de SMet, mostra uma correlação inversa com citocinas inflamatórias, destacando seu papel protetor.

Assim, concluímos que a SMet é caracterizada por uma relação complexa entre adipocinas e citocinas, mediado por alterações no perfil das células T. As intervenções terapêuticas que visem reduzir a inflamação crônica e restaurar o equilíbrio imunológico, bem como aumentar os níveis de adiponectina, podem ser promissoras no manejo da SMet. A compreensão aprofundada dessas interações é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes na prevenção e tratamento da síndrome metabólica, com potencial para reduzir significativamente a morbidade e mortalidade associadas a esta condição.

ANEXO 1

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFREE E GUINLE/HUGG/UNIRIO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da obesidade no perfil imune de pacientes atópicos

Pesquisador: Cleonice Alves de Melo Bento

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44951215.6.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.164.594

Data da Relatoria: 25/06/2015

Apresentação do Projeto:

IMPACTO DA OBESIDADE NO STATUS FUNCIONAL DAS CÉLULAS T E B DE PACIENTES ATÓPICOS

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste trabalho será correlacionar a frequência de células Th2/Th17/Th1 e Treg/Breg com o índice de massa corpórea e os níveis
periféricos de leptina em pacientes com alergias imediatas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O procedimento usado para colher o seu sangue é o mesmo utilizado nos exames de rotina. Portanto, trará risco mínimo.

Benefícios:

Os resultados do estudos não irão beneficiar diretamente. Eles irão nos ajudar a compreender como a obesidade pode exercer efeitos
adversos no sistema imune de pacientes alérgicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresentou de forma clara todas as pendências anteriores, descritas por este comitê de ética. O métodos foram descritos, o orçamento detalhado e explicitada sua origem (finaciamento

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775
Bairro: Tijuca **CEP:** 22.270-004
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)1264-5317 **Fax:** (21)1264-5177 **E-mail:** cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO

prórprio e da própria FIOCRUZ) e os testes estatísticos foram também descritos pelo pesquisador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Completos

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 30 de Julho de 2015

Assinado por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

ANEXO 2





TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"Impacto da Obesidade no status funcional das células T e B de pacientes atópico"

Subprojeto: "Impacto da Síndrome Metabólica no status funcional das células T e B de pacientes com Obesidade"

Explicação para o(a) paciente sobre a proposta do estudo

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo desse projeto será avaliar de que forma a síndrome metabólica modula as células do sistema imune de pacientes obesos.

2. PROCEDIMENTOS

Para o nosso estudo, iremos colher 3 (três) amostras do seu sangue periférico no volume de 10 ml por tubo. A princípio, nenhuma coleta de sangue a mais será necessária. Toda coleta do material biológico será conduzida com material adequado e estéril. Seu sangue não será usado nem para estudos genéticos nem tampouco com propósito comercial, e apenas os pesquisadores irão ter acesso ao material. Além disso, nós precisaremos de algumas informações contidas no seu prontuário, como, por exemplo, peso e altura, para que possamos calcular o seu índice de massa corpórea.

3. RISCOS E DESCONFORTOS

O procedimento usado para colher o seu sangue é o mesmo utilizado nos exames de rotina. Portanto, este lhe trará risco mínimo.

4. BENEFÍCIOS

Os resultados de nossos estudos irão nos ajudar a compreender como a síndrome metabólica pode exercer efeitos adversos no sistema imune de pacientes obesos. Portanto, nós não podemos lhe dar nenhuma garantia que você será beneficiado por participar dessa pesquisa.

5. ALTERNATIVA DE PARTICIPAÇÃO

A sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode desistir a qualquer momento.

6. *CUSTOS E COMPENSAÇÕES*

Você não irá pagar nem receber nada para participar desse estudo.

7. CONFIDENCIALIDADE

Todas as informações referentes a você, assim como todos os resultados obtidos, serão mantidas sob sigilo. Seu nome não será revelado, exceto para o grupo envolvido na pesquisa. Nenhuma publicação científica irá identificá-lo.

8. QUESTÕES E PROBLEMAS

Em caso de dúvida sobre a pesquisa ou direito dos pacientes poderá ser contactada a Dra CLEONICE BENTO por meio dos telefones (21) 2531-7908 ou do e-mail cbento@unirio.br, bem como o CEP do HUGG, por meio do telefone (21) 2264-5177 ou do email cephugg@gmail.com, ou no endereço Rua Mariz e Barros, nº 775 - 2º andar (Prédio da Direção do HUGG), Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, nos seguintes horários: de segunda a sexta-feira, de 8:30 às 12:00 horas.

9. CONSENTIMENTO

Caso você tenha lido e entendido todas as informações previamente descritas, e você ESPONTANEAMENTE concorde em participar desse estudo, favor assinar na linha abaixo.

Nome do(a) Paciente:

_____

Assinatura do(a) Paciente:

Eu certifico que expliquei a proposta do estudo ao paciente, e parece que ela entendeu os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

Assinatura do pesquisador:

Nome do(a) testemunha:

Assinatura da testemunha:

Data: ____/____/_____

REFERÊNCIAS

1. Oliveira LVA, Santos BNS dos, Machado ÍE, Malta DC, Velasquez-Melendez G, Felisbino-Mendes MS. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. Ciênc Saúde Coletiva. 2020;25:4269-80.

2. Dissanayake H. COVID-19 and metabolic syndrome. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2023;101753.

3. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabetic Medicine. 2006;23(5):469–80.

4. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep. 26 de fevereiro de 2018;20(2):12.

5. Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. Int J Sports Med. 2020;42:199-214.

6. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults: Findings From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002;287(3):356-9.

7. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. Int J Mol Sci. 2022;23(2):786.

8. Heredia FP de, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. Proc Nutr Soc. 2012;71(2):332-8.

9. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. Am J Physiol Cell Physiol. 2021;320(3)

10. Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. Mol Endocrinol. 2008;22(5):1023-31.

11. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. Clin Sci (Lond). 2021;135(6):731-52.

12. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015. 552 p.

13. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010;125(2):S24–32.

14. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. Cell Mol Immunol. 2019;16(7):634–43.

15. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. Annu Rev Immunol [Internet]. 2009 Apr 1;27(1):591–619. Available from: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132706

16. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T Cell Development and Transformation. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2011 Nov 10;27(1):539–62. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-092910-154008

17. Cantrell D. Signaling in Lymphocyte Activation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(6):a018788.

18. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology. 12 de setembro de 2018;14(2):49.

19. N. Fazilleau, L.J. Mcheyzer-Williams, M.G. Mcheyzer-Williams. Local development of effector and memory T helper cells. Curr. Opin. Immunol. 2007;19: 259-267

20. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. Annual Review of Immunology. 2010 april 23;28(Volume 28, 2010):445–89.

21. McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. The potential of CD4 T-cell memory. Immunology. 2010;130(1):1–9.

22. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends Immunol. 2014 Sep;35(9):436-42.

23. Makani S, Jen K, Finn P. New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. Curr Mol Med. 2008 Aug 1;8(5):359–64.

24. Bhaumik, S. & Basu, R. Cellular and molecular dynamics of Th17 differentiation and its developmental plasticity in the intestinal immune response. Front. Immunol. 2017; 8, 254.

25. Castro G, Liu X, Ngo K, Leon-Tabaldo AD, Zhao S, Luna-Roman R, et al. RORγt and RORα signature genes in human Th17 cells. PLOS ONE. 1º de agosto de 2017;12(8):e0181868.

26. Revu S, Wu J, Henkel M, Rittenhouse N, Menk A, Delgoffe GM, et al. IL-23 and IL-1β Drive Human Th17 Cell Differentiation and Metabolic Reprogramming in Absence of CD28 Costimulation. Cell Reports. 2018;22(10):2642–53.

27. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Expert Review of Clinical Immunology. 1o de maio de 2014;10(5):593–619.

28. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 10 de agosto de 2010;107(32):14292–7.
29. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. Nat Immunol.2012;13(10):991–9.

30. Kaufmann U, Kahlfuss S, Yang J, Ivanova E, Koralov SB, Feske S. Calcium Signaling Controls Pathogenic Th17 Cell-Mediated Inflammation by Regulating Mitochondrial Function. Cell Metabolism. 2019 may 7;29(5):1104-1118.e6.

31. Ito H, Seishima M. Regulation of the Induction and Function of Cytotoxic T Lymphocytes by Natural Killer T Cell. BioMed Research International. 2010;2010(1):641757.

32. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. Arch Immunol Ther Exp. 2014;62(6):449–58.

33. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015;135(3):626–35.

34. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. European Journal of Immunology. 2008;38(4):921–4.

35. Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next? Front Immunol. 24 de novembro de 2017;8:1578.

36. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. Annual Review of Immunology. 23 de abril de 2012;30(Volume 30, 2012):531–64.

37. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity. 2006 Aug;25(2):195-201.

38. Cipolletta D. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. Immunology. 2014;142(4):517-25.

39. Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, Kamarad V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2018;162(2):79-82.

40. Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. J Clin Invest. 2019;129(10):3990-4000.

41. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol. 2010;314(1):1-16.

42. Luo Y, Liu M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. J Mol Cell Biol. 2016;8(2):120-8.

43. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V, Horvath TL, La Cava A. Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. Trends Mol Med. 2010;16(6):247-56.

44. Endo Y, Yokote K, Nakayama T. The obesity-related pathology and Th17 cells. Cell Mol Life Sci. 2017;74(7):1231-45.

45. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):772-83.

46. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. J Biol Chem. 2010;285(9):6153-60.

47. Tsang JY, Li D, Ho D, Peng J, Xu A, Lamb J, et al. Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions. Int Immunopharmacol. 2011;11(5):604-9.

48. Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, MacIver NJ. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation To Link Nutrition and Immunity. J Immunol. 2014;192(1):136-44.

49. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. Int J Mol Sci. 2020;21(16):5887.

50. Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. J Immunol. 2005;174(11):6820-8.

51. Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, MacIver NJ. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation To Link Nutrition and Immunity. J Immunol. 2014;192(1):136-44.

52. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 2017;127(1):1-4.

53. Mohammadi M, Gozashti MH, Aghadavood M, Mehdizadeh MR, Hayatbakhsh MM. Clinical Significance of Serum IL-6 and TNF-α Levels in Patients with Metabolic Syndrome. Rep Biochem Mol Biol. 2017;6(1):74-9.

54. Popko K, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Plywaczewski R, Stoklosa A, Gorecka D, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-α and the development of inflammation in obese subjects. Eur J Med Res. 2010;15(2):120.

55. Clemente-Suárez VJ, Redondo-Flórez L, Beltrán-Velasco AI, Martín-Rodríguez A, Martínez-Guardado I, Navarro-Jiménez E, et al. The Role of Adipokines in Health and Disease. Biomedicines. 2023;11(5):1290.

56. Paragh G, Seres I, Harangi M, Fülöp P. Dynamic Interplay Between Metabolic Syndrome and Immunity. In: Camps J, editor. Oxidative Stress and Inflammation in

Non-communicable Diseases - Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics. Adv Exp Med Biol. 2014;824:1-13.

57. Gorgievska-Sukarovska B, Lipozencić J, Susac A. Obesity and allergic diseases. Acta Dermatovenerol Croat. 2008;16(4):231-5.

58. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. Autoimmun Rev. 2014;13(9):981-1000.

59. He Y, Jiang B, Wang J, Feng K, Chang Q, Fan L, et al. Prevalence of the Metabolic Syndrome and its Relation to Cardiovascular Disease in an Elderly Chinese Population. J Am Coll Cardiol. 2006;47(8):1588-94.

60. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. Lancet. 2005;366(9497):1640-9.

61. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. Front Cardiovasc Med. 2020;7:22.

62. Abdel-Moneim A, Mahmoud R, Allam G, Mahmoud B. Relationship between Cytokines and Metabolic Syndrome Components: Role of Pancreatic-Derived Factor, Interleukin-37, and Tumor Necrosis Factor-α in Metabolic Syndrome Patients. Indian J Clin Biochem. 2024;39(1):37-46.

63. Brakenhielm E, Cao Y. Leptin, Adiponectin, and Other Adipokines in Regulation of Adipose Tissue Angiogenesis. In: Cao Y, editor. Angiogenesis in Adipose Tissue. New York, NY: Springer; 2013. p. 187-228.

64. de F. Rocha AR, de S. Morais N, Priore SE, do C. C. Franceschini S. Inflammatory biomarkers and components of metabolic syndrome in adolescents: a systematic review. Inflammation. 2022 Feb 1;45(1):14-30.

65. Savulescu-Fiedler I, Mihalcea R, Dragosloveanu S, Scheau C, Baz RO, Caruntu A, et al. The interplay between obesity and inflammation. Life (Basel). 2024 Jul;14(7):856.

66. Gonzalez-Gay MA, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrua C, Sanchez-Andrade A, Martin J, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2006;24(1):83-6.

67. Ogata A, Morishima A, Hirano T, et al. Improvement of HbA1c during treatment with humanised anti-interleukin 6 receptor antibody, tocilizumab. Ann Rheum Dis. 2011;70:1164-5.

68. Schultz O, Oberhauser F, Saech J, Rubbert-Roth A, Hahn M, Krone W, et al. Effects of Inhibition of Interleukin-6 Signalling on Insulin Sensitivity and Lipoprotein (A) Levels in Human Subjects with Rheumatoid Diseases. PLoS One. 2010;5(12)

69. Owyang AM, Maedler K, Gross L, Yin J, Esposito L, Shu L, et al. XOMA 052, an Anti-IL-1β Monoclonal Antibody, Improves Glucose Control and β-Cell Function in the Diet-Induced Obesity Mouse Model. Endocrinology. 2010;151(6):2515-27.

70. Wang Q, Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. Front Immunol (2018) 9:2509. doi: 10.3389/fimmu.2018.02509

71. Pasquarelli-do-Nascimento G, Machado SA, de Carvalho JMA, Magalhães KG. Obesity and adipose tissue impact on T-cell response and cancer immune checkpoint blockade therapy. Immunother Adv. 2022;2(1)

72. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. Nat Med. 2009 Aug;15(8):930-9.

73. Sumarac-Dumanovic M, Stevanovic D, Ljubic A, Jorga J, Simic M, Stamenkovic-Pejkovic D, et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. Int J Obes (Lond). 2009 Jan;33(1):151-6. doi: 10.1038/ijo.2008.216.

74. Abouzeid S, Sherif N. Role of alteration in Treg/Th17 cells' balance in nephropathic patients with type 2 diabetes mellitus. Electron Physician. 2015 Aug;7(8):1613-8. doi: 10.19082/1613.

75. Zhang, S.; Gang, X.; Yang, S.; Cui, M.; Sun, L.; Li, Z.; Wang, G. The Alterations in and the Role of the Th17/Treg Balance in Metabolic Diseases. Front. Immunol. 2021, 12, 678355.

76. Wang L, Gao T, Li Y, et al. A long-term anti-inflammation markedly alleviated high-fat diet-induced obesity by repeated administrations of overexpressing IL10 human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther. 2022;13:259.

77. Beppu LY, Mooli RGR, Qu X, Marrero GJ, Finley CA, Fooks AN, et al. Tregs facilitate obesity and insulin resistance via a Blimp-1/IL-10 axis. JCI Insight. 2020;6(3):e140644.

78. Wu B, Wan Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. Int Immunopharmacol. 2020 Mar 1;80:106187.

79. Wensveen FM, Valentić S, Šestan M, Turk Wensveen T, Polić B. The 'big bang' in obese fat: events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. Eur J Immunol. 2015 Sep;45(9):2446-56.

80. Wang HB, Ghiran I, Matthaei K, Weller PF. Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. J Immunol. 2007;179(11):7585-92.

81. Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. Clin Exp Allergy. 2008 Aug;38(8):1254-63.

82. Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and obesity: potential link to metabolic disorders and chronic complications. Int J Mol Sci. 2020 May 18;21(10):3570.

83. Ighbariya A, Weiss R. Insulin resistance, prediabetes, metabolic syndrome: what should every pediatrician know? J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2017 Dec 30;9(Suppl 2):49-57.

84. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. Horm Mol Biol Clin Investig. 2014;18(1):37-45.

85. Kiernan K, Nichols AG, Alwarawrah Y, MacIver NJ. Effects of T cell leptin signaling on systemic glucose tolerance and T cell responses in obesity. PLoS One. 2023 Jun 5;18(6).

86. Matarese G, Cava A. The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol. 2004 Apr;4(4):371-9.

87. De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. Immunity. 2007 Feb 23;26(2):241-55.

88. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. Diabetes. 2005 Feb;54(2):534-9.

89. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 2002 Jan;13:134-41.

90. Hameed MS, AL-Khakani MF. The dual role of adiponectin and leptin in type 2 diabetes. J Popul Ther Clin Pharmacol. 2023 Jun 3;30(13):200-14.

91. Yoshimoto M, Sakuma Y, Ogino J, Iwai R, Watanabe S, Inoue T, et al. Sex differences in predictive factors for the onset of type 2 diabetes in Japanese individuals: a 15-year follow-up study. J Diabetes Investig. 2022;14(1): 37–47.

92. Wu O, Lu X, Leng J, Zhang X, Liu W, Yang F, et al. Reevaluating adiponectin's impact on obesity hypertension: a Chinese case-control study. BMC Cardiovasc Disord. 2024 Apr 13;24(1):208.

93. Li HY, Chiu YF, Hwu CM, Sheu WH, Hung YJ, Fujimoto W, et al. The negative correlation between plasma adiponectin and blood pressure depends on obesity: a family-based association study in SAPPHIRe. Am J Hypertens. 2008 Apr 1;21(4):471-6.

94. Nezhadali M, Mesbah-Namin SA, Hedayati M, Akbarzadeh M, Bonab LN, Daneshpour MS. Serum adiponectin and cortisol levels are not affected by studied ADIPOQ gene variants: Tehran lipid and glucose study. BMC Endocr Disord. 2022 Apr 18;22(1):104.

95. Kotani K, Yamada T, Taniguchi N. The association between adiponectin, HDL-cholesterol and α1-antitrypsin-LDL in female subjects without metabolic syndrome. Lipids Health Dis. 2010 Dec 30;9:147.

96. Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. Compr Physiol. 2018; 8:1031–63.

97. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2002;290:1084-9.

98. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2003;301:1045-50.

99. Firouzjaei A, Li GC, Wang N, Liu WX, Zhu BM. Comparative evaluation of the therapeutic effect of metformin monotherapy with metformin and acupuncture combined therapy on weight loss and insulin sensitivity in diabetic patients. Nutr Diabetes. 2016;6

100. Shibata S, Tada Y, Hau C, et al. Adiponectin regulates psoriasiform skin inflammation by suppressing IL-17 production from γδ-T cells. Nat Commun. 2015;6:7687.

101. Piccio L, et al. Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis. Eur J Immunol. 2013;43:2089-100.

102. Kasahara DI, et al. Pulmonary inflammation induced by subacute ozone is augmented in adiponectin-deficient mice: role of IL-17A. J Immunol. 2012;188:4558-67.

103. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. J Biol Chem. 2010 Feb 26;285(9):6153-60.