

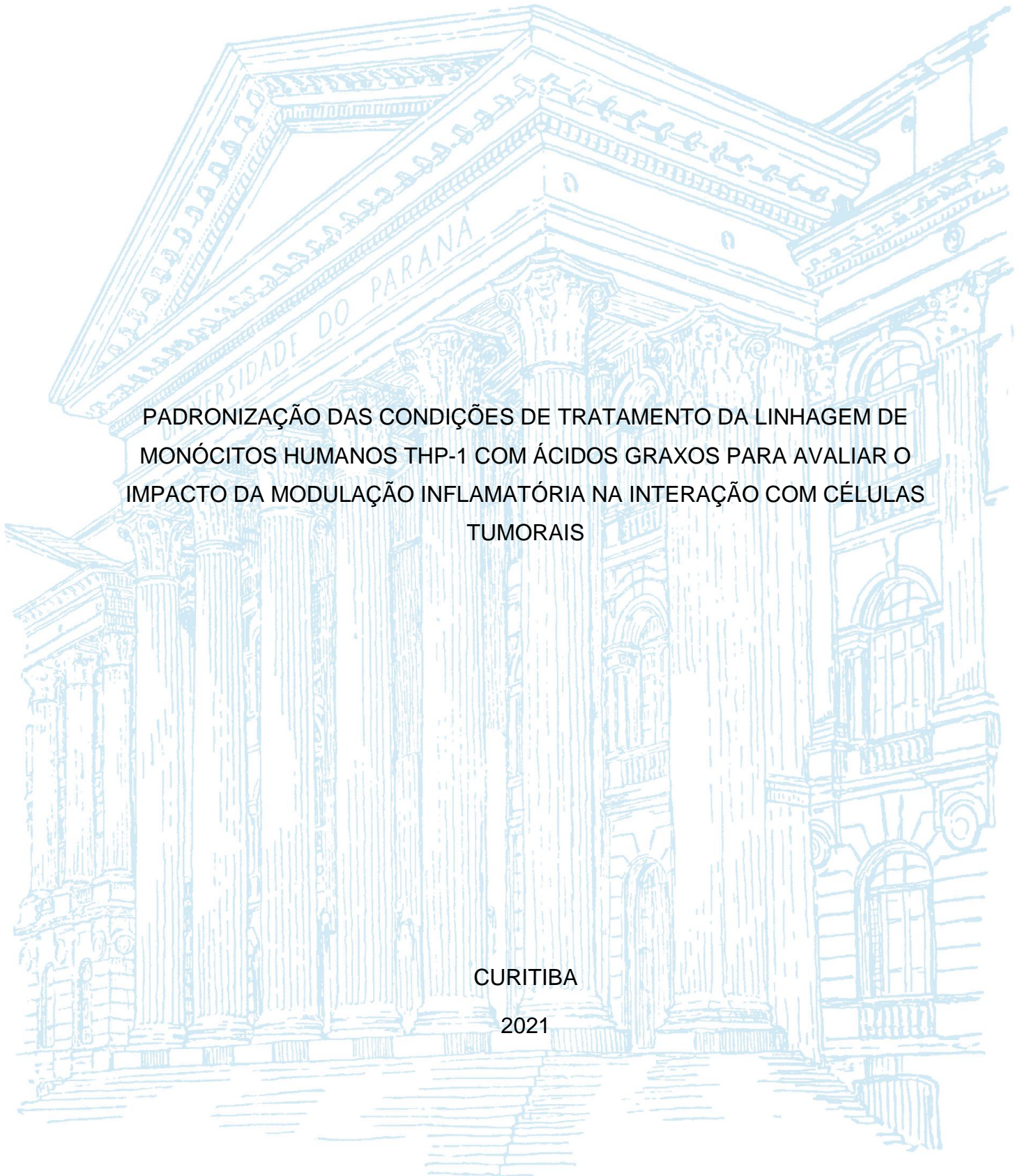
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA CROCKETT PEREIRA

PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DA LINHAGEM DE
MONÓCITOS HUMANOS THP-1 COM ÁCIDOS GRAXOS PARA AVALIAR O
IMPACTO DA MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS
TUMORAIS

CURITIBA

2021



VANESSA CROCKETT PEREIRA

PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DA LINHAGEM DE
MONÓCITOS HUMANOS THP-1 COM ÁCIDOS GRAXOS PARA AVALIAR O
IMPACTO DA MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS
TUMORAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Amanda Rabello Crisma

CURITIBA

2021

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO CRÔNICA | 19 |
| 2.2 A INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA PATOGÊNESE DO CÂNCER | 22 |
| 2.3 O PERFIL DOS MACRÓFAGOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL..... | 24 |
| 2.4 ÁCIDOS GRAXOS E MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFLAMAÇÃO CRÔNICA..... | 25 |
| 2.5 PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS THP-1 | 28 |
| 3. OBJETIVO | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 CULTIVO DE CÉLULAS THP-1 | 32 |
| 4.2 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PMA UTILIZADA PARA A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1 | 32 |
| 4.2.1 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR..... | 32 |
| 4.2.1.1 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DE CRISTAL VIOLETA..... | 33 |
| 4.2.1.2 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA OCUPADA PELAS CÉLULAS ADERIDAS..... | 34 |
| 4.3 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO DOS ÁCIDOS GRAXOS..... | 34 |
| 4.3.1 PLAQUEAMENTO E TRATAMENTO COM OS ÁCIDOS GRAXOS | 34 |
| 4.3.2 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE PELO ENSAIO DE MTT | 35 |
| 4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA UTILIZAÇÃO DE LPS COMO CONTROLE POSITIVO PARA AVALIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS | 35 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO..... | 35 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PMA PARA DIFERENCIAR CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS | 37 |
| 5.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TRABALHO DOS ÁCIDOS GRAXOS..... | 42 |
| 5.3 PADRONIZAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE LPS COMO INDICADOR DE ESTIMULAÇÃO DE THP-1 | 46 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |

RESUMO

A alta ingestão de ácidos graxos é um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades, como o câncer colorretal. Essas doenças possuem sua patogênese influenciada pelo quadro de inflamação crônica que é instaurada. Os ácidos graxos saturados possuem um papel fundamental na inflamação crônica pois são capazes de estimular a resposta inflamatória em macrófagos. Por outro lado, os ácidos graxos insaturados possuem propriedades anti-inflamatórias e protetoras. Diante de tais evidências, buscou-se padronizar as condições de tratamento de células da linhagem THP-1 com os ácidos graxos palmítico (PA) e docosahexaenóico (DHA) para determinar como ácidos graxos saturados e insaturados da classe ômega-3 modulam a função inflamatória em uma linhagem de monócitos diferenciados em macrófagos, interferindo na interação com células tumorais por meio da produção de mediadores que influenciam a fisiologia da célula tumoral. Para isso, buscou-se determinar condições experimentais para a diferenciação de células THP-1 em macrófagos por meio dos ensaios de adesão celular e produção de óxido nítrico (NO), bem como determinar a concentração de trabalho dos ácidos PA e DHA baseada na avaliação de citotoxicidade induzida por esses ácidos graxos; além de padronizar as condições experimentais para utilização do lipopolissacarídeo (LPS) como controle positivo para avaliação da função inflamatória de células THP-1 diferenciadas. Os ensaios de adesão celular e produção de óxido nítrico (NO) indicaram que a concentração de PMA para diferenciar células THP-1 é de 5 ng/mL no tempo de 48 horas. Os resultados preliminares das concentrações de trabalho do PA mostraram que no tempo de 24 horas a concentração escolhida seria de 125 μ M e no tempo de 48 horas seria de 100 μ M. Já para o DHA, a concentração escolhida seria de 50 μ M para os dois tempos de tratamento. A diferenciação de células THP-1. Os resultados obtidos na padronização das condições experimentais para utilização do LPS como controle positivo de estimulação mostraram que a produção de NO por células THP-1 diferenciadas é baixa ou inexistente.

Palavras-chave: obesidade; ácidos graxos; macrófagos; inflamação; câncer;

ABSTRACT

The high intake of fatty acids is one of the factors involved in the development of obesity and its comorbidities, such as colorectal cancer. These diseases have their pathogenesis influenced by the chronic inflammation that is established. Saturated fatty acids play a key role in chronic inflammation as they are able to stimulate the inflammatory response in macrophages. On the other hand, unsaturated fatty acids have anti-inflammatory and protective properties. In view of such evidence, we sought to standardize the treatment conditions of THP-1 cells with palmitic (PA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids to determine how saturated and unsaturated fatty acids of the omega-3 class modulate inflammatory function in a lineage of monocytes differentiated into macrophages, interfering with the interaction with tumor cells through the production of mediators that influence tumor cell physiology. To do so, we sought to determine experimental conditions for the differentiation of THP-1 cells into macrophages through cell adhesion assays and nitric oxide (NO) production, as well as to determine the working concentration of PA and DHA acids based on the evaluation of cytotoxicity induced by these fatty acids; in addition to standardizing the experimental conditions for the use of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control to evaluate the inflammatory function of differentiated THP-1 cells. Cell adhesion and nitric oxide (NO) production assays indicated that the concentration of PMA to differentiate THP-1 cells is 5 ng/mL at the time of 48 hours. The preliminary results of the working concentrations of the PA showed that at the time of 24 hours the concentration chosen would be of 125 μ M and at the time of 48 hours it would be of 100 μ M. For DHA, the concentration chosen would be 50 μ M for the two treatment times. The differentiation of THP-1 cells. The results obtained in the standardization of experimental conditions for the use of LPS as a positive stimulation control showed that the production of NO by differentiated THP-1 cells is low or non-existent.

Keywords: obesity; fatty acids; macrophages; inflammation; cancer.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos vêm demonstrando a relação existente entre a obesidade e a inflamação crônica, resultando em resistência à insulina e *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), além de outras comorbidades como esteatose hepática, dislipidemias, doenças cardiovasculares (HOTAMISLIGIL, 2006; DE HEREDIA et al., 2012; ZATTERALE et al., 2020; WU; BALLANTYNE, 2020) e alguns tipos de câncer (KOLB et al., 2016; DENG et al., 2016; IYENGAR et al., 2016; AVGERINOS et al., 2018). Lipídios são macronutrientes que podem ser tanto sintetizados pelo organismo (ácidos graxos não essenciais) quanto obtidos pela dieta (ácidos graxos essenciais); no entanto, o consumo excessivo de determinadas classes de lipídios, associado ou não a dietas hipercalóricas, tem levado ao desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades (AVGERINOS et al., 2018).

A relação dos ácidos graxos saturados e insaturados com a inflamação e os mecanismos envolvidos nesse processo são elucidados em trabalhos como os de Rogero e colaboradores (2018) e Zhou e colaboradores (2020). De acordo com Rogero e Calder (2018), o caráter pró-inflamatório de ácidos graxos saturados e anti-inflamatório de ácidos graxos insaturados, mais especificamente aqueles da classe ômega-3, já é bem estabelecido. Além disso, o papel protetor dos ácidos graxos ômega-3 contra diversos tipos de câncer, principalmente o colorretal, e seus benefícios como possível tratamento adjuvante também tem sido estudado (COCKBAIN et al., 2014; VOLPATO; HULL, 2018).

Os macrófagos são células do sistema imune que desempenham um papel crucial na inflamação crônica em indivíduos obesos, existindo diversas hipóteses para descrever os mecanismos que culminam na ativação dessas células e na instauração do quadro inflamatório (HOTAMISLIGIL, et al., 1995; HOSOGAI et al., 2007; HEREDIA et al., 2012; IZAOLA et al., 2015; UYAR; SANLIER, 2019; THAPA; LEE, 2019). Sendo assim, sabendo-se que os ácidos graxos saturados desencadeiam a inflamação crônica que acompanha a obesidade, principalmente por meio da modulação de macrófagos, e que esse quadro está envolvido no desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer, principalmente colorretal, esse estudo buscou padronizar as condições para utilizar células da linhagem THP-1 no estudo da modulação exercida pelos ácidos graxos

PA e DHA em macrófagos e sua influência na fisiologia de células tumorais. Com isso, pretende-se elucidar o papel específico dos ácidos graxos saturados e ômega-3 no desenvolvimento e progressão tumoral, tanto por ação direta em células neoplásicas, como por modulação do microambiente, a fim de se caracterizar potenciais benefícios do consumo ou suplementação com ácidos graxos ômega-3 como adjuvantes na estratégia terapêutica para o controle do câncer.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO CRÔNICA

A obesidade é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, 2010). Atualmente, ela atinge grande parte da população mundial, tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos. No Brasil, de acordo com uma pesquisa realizada pela Vigitel (Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico), a prevalência da obesidade no país aumentou de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. O excesso de peso também aumentou, passando de 42,6% da população em 2006 para 55,7% em 2018 (VIGITEL, 2018). Dentre os fatores que contribuem fortemente para o desenvolvimento da doença estão o consumo elevado de alimentos processados, ricos em carboidratos e lipídios, e o sedentarismo (INCA, 2020). A obesidade é um problema de saúde pública, tendo como principais consequências o desenvolvimento da resistência à insulina e o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), acarretando diversas comorbidades associadas, como esteatose hepática, dislipidemias, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres. Todos esses quadros são influenciados pelo estado de inflamação crônica subclínica decorrente da obesidade (HOTAMISLIGIL et al., 2006). Diversos estudos têm demonstrado que o processo inflamatório acarretado pelo alto consumo de ácidos graxos inicia-se no tecido adiposo. Este tecido possui diversas células como adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T, que desempenham variadas funções (IZAOLA et al., 2015). Os

adipócitos são células responsáveis pelo armazenamento de triglicerídeos (usados como fonte de energia para o organismo), também sendo capazes de secretar diversos mediadores envolvidos na manutenção da homeostase metabólica, como enzimas, fatores de crescimento, hormônios e adipocinas (SHOELSON et al., 2016). Dentre as adipocinas, podem ser citadas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a leptina, a adiponectina, a IL-6, a resistina, a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), sendo que TNF- α , IL-6, MCP-1 e PAI-1 são sintetizados tanto por adipócitos quanto por macrófagos e outras células do sistema imune. Dessa forma, o tecido adiposo desempenha um importante papel na atividade metabólica do organismo, pois está continuamente secretando mediadores que atuam modulando o gasto e o armazenamento de energia, o apetite, a sensibilidade à insulina, diversas funções endócrinas e reprodutivas, a imunidade e a inflamação. Nesse contexto, o aporte excessivo de ácidos graxos saturados leva ao aumento da produção de adipocinas e mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo, resultando em um quadro de inflamação crônica de baixo grau que está envolvido na patogênese de diversos distúrbios associados ao consumo de dietas hiperlipídicas (SHOELSON et al., 2007).

A inflamação crônica presente no quadro de obesidade e outros distúrbios metabólicos associados, também chamada de lipoinflamação ou metainflamação, não possui um único mecanismo, sendo que diversas hipóteses têm sido propostas para explicá-la. A existência de um componente inflamatório na obesidade começou a ser evidenciada a partir da observação que indivíduos obesos apresentavam aumento da citocina TNF- α na circulação (HOTAMISLIGIL, et al., 1995). Essa citocina, produzida no tecido adiposo por adipócitos e macrófagos ativados, também se encontra elevada em modelos de obesidade em roedores (CILDIR et al., 2013). Esta citocina, por inibir a sinalização intracelular do receptor de insulina, está envolvida no quadro de resistência a este hormônio, que resulta da obesidade (HOTAMISLIGIL et al., 1995).

Outra hipótese relacionada ao desenvolvimento de um quadro inflamatório no tecido adiposo pode estar associada ao excesso de ácidos graxos provenientes da dieta hiperlipídica (principalmente ácidos graxos saturados), levando ao seu acúmulo neste tecido e à hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Como consequência, é

comum o aparecimento de zonas de hipóxia e morte de adipócitos, visto que a circulação passa a ser insuficiente para a demanda do tecido. Estudos mostraram que esse evento leva ao estado de inflamação pelo aumento do estresse oxidativo, produção de citocinas e infiltração de macrófagos no local (HOSOGAI et al., 2007 e IZAOLA et al., 2015).

Por fim, a inflamação associada à obesidade pode ser explicada pela atuação de algumas adipocinas, mais especificamente leptina e adiponectina, que modulam a síntese e secreção de citocinas inflamatórias (UYAR; SANLIER, 2019). A leptina, em condições normais, é responsável por regular a função imune em vários níveis, seja estimulando a produção e mobilização de monócitos, a diferenciação em macrófagos, a ativação de linfócitos ou induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, ou IL-12 (HEREDIA et al., 2012). O aumento de leptina na circulação é proporcional ao aumento da massa de gordura corporal. A adiponectina, por sua vez, possui uma função anti-inflamatória, anti-aterogênica, anti-angiogênica, além de aumentar a sensibilidade à insulina. Ela inibe a função fagocítica e a síntese de TNF- α por macrófagos e, ao contrário da leptina, sua concentração plasmática diminui conforme a massa de gordura corporal aumenta (UYAR; SANLIER, 2019). No quadro de obesidade, o aumento da leptina e a diminuição da adiponectina no tecido adiposo contribuem para a manutenção do estado de inflamação (HEREDIA et al., 2012).

É descrito que o tecido adiposo de indivíduos saudáveis apresenta predomínio de macrófagos no estado alternativo de ativação (M2, que possui caráter anti-inflamatório e regulatório), caracterizados pela produção de mediadores como IL-10, arginase-1, TGF- β (fator de crescimento transformante beta) e ligante de quimiocina CC (CCL) 17, CCL18, CCL22 e CCL24 (MOGHADDAM et al., 2018), sendo identificados pelos marcadores de superfície CD206 ou MRC1 (receptor de manose tipo C1), CD204, CD163, SOCS2 (supressor de sinalização de citocinas tipo 2), IRF4 (fator de regulação de interferon tipo 4) (GRAÇA; CORRÊA, 2018 e WU et al. 2020). O quadro de obesidade está associado a uma troca do fenótipo M2 para o M1, identificado pelos marcadores CD68, CD80, CD86, MHCII (complexo principal de histocompatibilidade de classe 2), iNOS (óxido nítrico sintase indutível), CD11c, e M2BP (*Mac-2 binding protein*) (GRAÇA; CORRÊA, 2018 e SICA; MANTOVANI,

2012). O fenótipo M1 é considerado o estado clássico de ativação, apresentando caráter pró-inflamatório (LUMENG et al., 2007). Além disso, indivíduos obesos apresentam aumento do aporte de macrófagos M1 para o tecido adiposo. Isso ocorre porque o aumento do número e tamanho dos adipócitos, somado aos altos níveis de ácidos graxos livres neste tecido e a hipóxia subsequente, promove maior recrutamento e ativação de macrófagos, que passam a secretar mais citocinas, como IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, e quimiocinas, aumentando o seu próprio infiltrado no tecido adiposo (THAPA; LEE, 2019). Essa condição contribui para o remodelamento e desregulação metabólica do tecido, promovendo e sustentando um quadro inflamatório que repercutirá tanto localmente quanto sistemicamente (IZAOLA et al., 2015), contribuindo para a disfunção metabólica decorrente da obesidade.

2.2 A INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA PATOGÊNESE DO CÂNCER

A obesidade, além da inflamação crônica, é desencadeante de diversas comorbidades associadas. Dentre elas, está a predisposição ao desenvolvimento de tumores, como colorretal, do esôfago, pâncreas, rins, mama, endométrio e próstata, além de linfoma não-Hodgkin e mieloma. De uma maneira geral, câncer é o nome dado a um conjunto de doenças, nas quais ocorre o crescimento desordenado, rápido e agressivo de células, que podem invadir órgãos e tecidos (INCA, 2019). Na literatura, existem diversas hipóteses para explicar a correlação entre a obesidade e o câncer. A mais descrita e aceita atualmente tem como base a disfunção do tecido adiposo envolvendo diversos mecanismos, que possivelmente contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral: inflamação crônica, resistência à insulina e aumento da síntese de adipocinas e hormônios esteróides (SALAÜN et al., 2016).

A inflamação crônica gera um ambiente propício para o crescimento de tumores. A hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, causadas pelas dietas hiperlipídicas e hipercalóricas, promovem hipóxia do tecido adiposo e consequente morte dos adipócitos, desencadeando um processo inflamatório. Paralelamente, o aumento de MCP-1 e outras citocinas envolvidas no processo inflamatório, recruta macrófagos que se acumulam ao redor dos adipócitos mortos ou em processo de morte, formando as chamadas *Crown-like Structures* (CLS), que sinalizam para a

fagocitose desses adipócitos. Os ácidos graxos livres liberados (principalmente ácidos graxos saturados) se ligam aos receptores do tipo TLR-4 presentes nos macrófagos, levando ao aumento da expressão de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias dependentes da ativação do fator de transcrição NF- κ B, como TNF- α e IL-1 β .

O envolvimento de NF- κ B e do quadro inflamatório crônico no desenvolvimento e progressão tumoral tem sido evidenciado na literatura (IYENGAR et al., 2016). A inflamação pode influenciar o desenvolvimento e progressão tumoral de forma intrínseca e extrínseca. A forma intrínseca é decorrente do próprio processo de carcinogênese e envolve a ativação de oncogenes, bem como a inativação de genes supressores tumorais. Tais mutações favorecem a secreção de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , COX-2 e quimiocinas, por parte das células transformadas, que atraem monócitos e outras células do sistema imune, além de promoverem a angiogênese, criando um microambiente inflamatório tumoral. Já a forma extrínseca, compreende distúrbios inflamatórios e processos infecciosos que podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer em determinadas partes do corpo (como por exemplo, infecção por *H. pylori* aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer gástrico), visto que colaboram para o aumento de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios no local a ser formado o microambiente tumoral. Os fatores intrínsecos e extrínsecos convergem, resultando na ativação do NF- κ B e outros fatores de transcrição como STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e HIF1 α (fator induzível por hipóxia 1 α) em células tumorais. Esses fatores ativam a expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF- α), moléculas de adesão, iNOS e COX-2, além de genes antiapoptóticos. Tais mediadores e moléculas favorecem a proliferação, a sobrevivência, bem como a aquisição de fenótipo agressivo pelas células tumorais, contribuindo também na indução da angiogênese e metástase (MANTOVANI, 2008).

O comprometimento da sinalização da insulina em decorrência da obesidade resulta em um quadro de hiperglicemia. Como uma tentativa de manter a homeostase metabólica, o pâncreas passa a secretar mais esse hormônio e seu aumento estimula a síntese de IGF-1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-

1), que por sua vez, promove a proliferação e inibe a apoptose de células tumorais, além de estimular a angiogênese, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão de diversos tipos de tumores (SALAÜN et al., 2016 & IYENGAR et al., 2016). Além disso, tem sido demonstrado que o balanço entre adiponectina e leptina possui relação direta com o aparecimento de neoplasias. Em indivíduos obesos, é observada diminuição nos níveis de adiponectina e aumento de leptina, sendo que esta última não apenas estimula a produção das citocinas TNF- α e IL-6 (que possuem funções pró-tumorais), bem como inibe a apoptose de células tumorais via ativação da sinalização mediada pela AKT (KOLB et al., 2016 e SOUZA et al., 2014).

O câncer colorretal é um dos tipos de câncer gastrointestinais mais comuns, apresentando alta incidência mundial e altas taxas de morbidade e mortalidade. No Brasil, é o terceiro principal tipo de câncer que acomete homens e mulheres. De acordo com o INCA, a previsão para 2020 foi de 17.760 novos casos em homens e de 20.470 em mulheres (INCA, 2019). Estudos mostram que o risco e a incidência de câncer colorretal aumentam conforme o IMC (Índice de Massa Corporal) do indivíduo, sendo maior em pessoas obesas. A inflamação do tecido adiposo e da mucosa colônica decorrente de uma dieta não saudável, rica em ácidos graxos saturados, tem sido associada ao aumento da prevalência do carcinoma colorretal. O consumo elevado de lipídios aumenta a quantidade de ácidos graxos livres e ácidos biliares. Estes últimos são metabolizados pela microbiota intestinal, gerando ácidos biliares secundários, considerados indutores de carcinogênese colorretal por promoverem o aumento de mediadores pró-inflamatórios e do estresse oxidativo (SONG et al., 2015). Além disso, o aumento de TNF- α e leptina em indivíduos obesos estimula a produção de IL-6, que aumenta a proliferação de células epiteliais do cólon (FENTON et al., 2006 e KOLB et al., 2016), contribuindo para o desenvolvimento desse tipo de tumor.

2.3 O PERFIL DOS MACRÓFAGOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL

A população de macrófagos é um importante constituinte do microambiente tumoral. No câncer colorretal, a evolução da doença ocorre a partir de uma transição adenoma-carcinoma, sendo que o perfil dos macrófagos presentes no microambiente se alterna entre os fenótipos M1 e M2, dependendo do estágio de desenvolvimento

tumoral (CHYLIKOVA, 2018). Em situações fisiológicas, é esperado o povoamento da região colônica por macrófagos M2, que possuem uma função homeostática nesse contexto. Com o desenvolvimento do adenoma, é desencadeada uma resposta imunológica antitumoral que resulta em recrutamento e acúmulo de macrófagos M1 neste tumor benigno, com consequente produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como MCP-1, TNF- α , IL-1 β e COX-2 (IYENGAR et al., 2016). Nesse momento, a inflamação crônica instaurada contribui fortemente para o desenvolvimento e a progressão tumoral, promovendo a evolução para adenoma tardio, e posteriormente, para a transformação maligna do epitélio, resultando no câncer colorretal (RAYMOND et al. 2016).

Para a sobrevivência do tumor é importante que os macrófagos ali residentes passem a expressar um fenótipo M2, prevenindo uma resposta inflamatória tumoricida e secretando mediadores antiinflamatórios, como IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 e expressando proteínas de superfície, como CD206, CD204 e CD163, que inibem a ativação de linfócitos CD8, promovendo o remodelamento da matriz extracelular a fim de potencializar o crescimento tumoral e, futuramente, a ocorrência de metástases (ISIDRO; APPEYARD, 2016 e WU et al., 2020).

2.4 ÁCIDOS GRAXOS E MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFLAMAÇÃO CRÔNICA

A obesidade está associada ao elevado consumo de alimentos ricos em lipídios, mais especificamente, ácidos graxos (AG). Os AGs são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia de hidrocarboneto podendo variar de 4 a 36 carbonos. Dependendo da quantidade de ligações duplas nessa cadeia eles podem ser considerados saturados (não possuem ligações duplas) ou insaturados (possuem uma ou mais ligações duplas). Também podem ser divididos em *cis* ou *trans*, dependendo da sua configuração espacial. Ácidos graxos na conformação *cis* possuem as moléculas de hidrogênio da dupla ligação do mesmo lado do plano; já nos ácidos graxos na conformação *trans* as moléculas de hidrogênio estão em lados opostos (TVRZICKA et al., 2011). Os AGs insaturados possuem a denominação “ômega” quando as insaturações se encontram a partir do grupamento metil da cadeia carbônica. Existem diversas classes de ácidos graxos insaturados, como ácidos graxos monoinsaturados *cis*, representados principalmente pelos ácidos

oleico e palmitoleico; ácidos graxos monoinsaturados *trans*, como os ácidos elaídico e vacênico; ácidos graxos poliinsaturados, sendo o ômega-3 e ômega-6 os principais representantes, possuindo a insaturação no terceiro e no sexto carbono, respectivamente (TVRZICKA et al., 2011). Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser obtidos de fontes animais ou vegetais. Muitas plantas produzem os ácidos linoleico (ômega-6) e alfa-linolênico (ômega-3) e por isso são muito encontrados em sementes, castanhas e óleos vegetais, fazendo parte da dieta humana. Como os seres humanos não sintetizam ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, necessitam obtê-los da dieta, sendo considerados ácidos graxos essenciais (CALDER, 2017).

Depois de ingeridos, os AGs linoleico e alfa-linolênico podem sofrer a ação das enzimas alongase e dessaturase (MARTIN et al., 2006). O ácido linoleico é convertido primeiramente a ácido gama-linoleico e posteriormente a ácido araquidônico. O ácido alfa-linolênico é convertido em ácido eicosapentaenóico (C20:5, EPA) e esse, posteriormente, em ácido docosahexaenóico (C22:6, DHA) (CALDER, 2017). A razão ideal de ingestão de AG ômega-6 para AG ômega-3 é de uma a quatro vezes maior (ou seja, entre 1:1 e 4:1). Entretanto, na dieta ocidental, esta razão ocorre entre 10:1 a 30:1 (NELSON; COX, 2008), ou seja, uma ingestão de AG ômega-6 muito maior, contribuindo para a instalação de um desequilíbrio metabólico.

Os AG n-3, eicosapentaenóico (EPA) e DHA, são encontrados em peixes, principalmente gordurosos, como salmão, atum, sardinha e arenque, e em suplementos feitos com óleo de peixe. Eles são conhecidos pelas suas propriedades antiinflamatórias e efeitos benéficos em doenças cardiovasculares e aterosclerose, pois promovem diminuição da pressão sanguínea e das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis. Além disso, reduzem o quadro inflamatório em doenças crônicas e autoimunes, como artrite reumatoide e diabetes. Uma dieta rica em EPA e DHA aumenta a quantidade desses AGs nas membranas celulares e na circulação sanguínea, substituindo os AGs n-6 nesses locais (como o ácido araquidônico, ARA, e o linoleico), modulando diferentes vias de sinalização. Além disso, o EPA inibe o metabolismo do ARA, diminuindo a expressão do gene da COX-2 e, conseqüentemente, a síntese de eicosanóides pró-inflamatórios (ROGERO;

CALDER, 2018 e CALDER, 2017). O EPA também é substrato da ciclooxigenase (COX), da lipoxigenase (LOX) e de enzimas do citocromo P450 que sintetizam eicosanóides; no entanto, os produtos do metabolismo do EPA, resolvinas e protectinas, apresentam caráter anti-inflamatório. O DHA, por sua vez, inibe a expressão ICAM-1 (molécula de adesão intracelular), uma glicoproteína expressa por células endoteliais e imunoinflamatórias em resposta ao TNF- α , responsável pelo recrutamento de leucócitos da circulação para os locais de inflamação (YANG et al, 2012 e BUI et al., 2020).

Os diferentes ácidos graxos interagem com receptores em macrófagos e, dessa forma, modulam a expressão de genes envolvidos na polarização e respostas pró e anti-inflamatórias (YUM et al., 2016). Além disso, também podem influenciar a sinalização celular entre adipócitos e macrófagos, sendo importantes determinantes do perfil de citocinas expressas. O desbalanço na ingestão dos ácidos ômega-3 e ômega-6 e o elevado consumo de ácidos graxos saturados são fatores que se demonstraram estar relacionados à síndrome metabólica e ao perfil de expressão gênica associado à obesidade, bem como ao comprometimento da função do tecido adiposo e indução de resistência à insulina (PAKIET et al., 2019). Além disso, os AGs também podem modular a resposta imunoinflamatória, estabelecendo uma relação entre dieta hiperlipídica, obesidade e inflamação crônica (ROGERO; CALDER, 2010).

Os AGs saturados, como o ácido palmítico e o láurico, são capazes de estimular a resposta inflamatória em macrófagos por meio da interação com os receptores TLR-4 e TLR-2, ativando a via de sinalização do fator de transcrição NF κ B e induzindo a expressão de COX-2 e mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12 (ROGERO; CALDER, 2018 e PAKIET et al., 2019). Altas concentrações de ácido palmítico em macrófagos promove estresse no retículo endoplasmático, com consequente ativação da PKC pelos metabólitos de diacilglicerol, exacerbando a resposta inflamatória (KORBECKI; RUSINEK, 2019). Foi observado que em ratos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura, principalmente ácidos graxos saturados, os macrófagos residentes no tecido adiposo são polarizados para o fenótipo M1; porém quando os ratos receberam ácidos graxos ômega-3, foi verificada a polarização em direção ao fenótipo M2. Também foi

observado que a classe ômega-3 promove um perfil anti-inflamatório por meio da sinalização do receptor acoplado à proteína G-120 (GPR120), aumentando a sensibilidade à insulina em ratos obesos, sendo que disfunções nesse receptor resultavam em um quadro de obesidade. Além disso, os mediadores lipídicos do DHA (pertencente à classe ômega-3), como a resolvina D-1, têm sido associados a uma diminuição dos macrófagos presentes no tecido adiposo e a uma troca na polarização dos macrófagos para o perfil M2 (MASOODI et al., 2015). Dessa forma, a redução do consumo de ácidos graxos saturados e o aumento do consumo de ácidos graxos ômega-3 exerce efeitos benéficos na redução da inflamação sistêmica, principalmente pelos efeitos exercidos em macrófagos (ROGERO; CALDER, 2018).

Sabendo-se que o desenvolvimento e a progressão tumoral são influenciados pela presença de um ambiente pró-inflamatório, e que ácidos graxos modulam a ativação e a produção de mediadores inflamatórios por leucócitos, torna-se necessário entender como diferentes classes de ácidos graxos modulam especificamente a função inflamatória de macrófagos, influenciando na interação com células tumorais.

2.5 PADRONIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO E CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS THP-1

O estudo da função inflamatória de macrófagos pode ser realizado *in vitro*, utilizando modelos que empregam tanto macrófagos primários, quanto linhagens celulares. Para a realização do presente trabalho, optou-se por utilizar a linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda THP-1 ao invés de monócitos presentes no sangue periférico. A THP-1 é uma linhagem de células em suspensão, que pode ser diferenciada em macrófago com o uso de PMA (*phorbol-12-miristato-13-acetato*), tornando-se aderente (*AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION*, C2021).

Embora o uso de monócitos primários permita a obtenção de resultados mais fidedignos em relação ao que acontece no organismo, existem algumas dificuldades quanto ao seu uso. Os monócitos obtidos diretamente a partir da coleta do sangue periférico de um doador (humano ou cobaia) não são capazes de proliferar em grande extensão nos cultivos *in vitro* e nem podem ser conservados em nitrogênio

líquido, sendo necessárias várias coletas de doadores para a realização de experimentos. Além disso, o número restrito de células obtidas representa uma limitação aos protocolos, onde é necessário um grande número de células. Ainda, deve ser levada em consideração a existência de uma variabilidade interindividual nos monócitos dos doadores, o que poderia resultar em variação dos resultados experimentais. Dessa forma, linhagens imortalizadas com características similares aos monócitos e macrófagos primários têm sido utilizadas em muitos experimentos para minimizar a influência da limitada capacidade proliferativa e do curto tempo de vida de células primárias em culturas *in vitro* e da variação interindividual (DAIGNEAULT et al., 2010; MAEß et al., 2014 e TEDESCO, 2018). Entre essas linhagens, a THP-1 apresenta diversas similaridades com monócitos primários humanos, além de ter a capacidade de poder ser diferenciada em macrófagos por estímulos externos, como ésteres de forbol e vitamina D (MAEß et al., 2014). De acordo com Tedesco et al. (2018), as células THP-1 são mais fáceis de cultivar devido à sua alta capacidade de replicação, além de poderem ser congeladas em seu estado não diferenciado; ainda, possuem uma única origem genética, o que minimiza a variabilidade fenotípica. Por outro lado, a desvantagem de se realizar estudos utilizando a linhagem celular THP-1, é que ela possui uma origem tumoral. Isso pode levar a alterações do fenótipo e dos atributos moleculares dessas células, podendo diferir dos apresentados por monócitos primários. Portanto, deve-se levar em consideração que modelos celulares empregando monócitos primários ou células de linhagem podem não se sobrepor em todos os espectros de respostas esperadas (TEDESCO et al. 2018). Apesar disso, as células THP-1 têm sido amplamente usadas em diversas áreas de pesquisa, visto que podem responder aos protocolos de polarização usados em monócitos primários (MAEß et al., 2014 e TEDESCO et al., 2018). Nesse sentido, os resultados obtidos devem ser comparados com monócitos primários sempre que as células THP-1 forem usadas em um novo modelo experimental e interpretados levando-se em consideração as diferenças existentes entre a linhagem e a célula primária.

A diferenciação de células THP-1 em macrófagos tem sido amplamente usada como um modelo *in vitro* de macrófagos humanos em estudos inflamatórios (PARK et al., 2007). Entre os estímulos utilizados, os ésteres de forbol (como PMA)

são análogos do diacilglicerol e, portanto, ativadores da proteína quinase C (PKC) (MAEß et al., 2014). A ativação dessa via de sinalização promove a diferenciação das células THP-1 em macrófagos, observada pelo aumento da adesão e da expressão de marcadores de superfície associados com macrófagos (CD14, CD36, TL-R2 e CR3 (CD11b/CD18), bem como por mudanças morfológicas e fisiológicas (DAIGNEAULT et al., 2010 e MAEß et al., 2014). Quando diferenciadas, tornam-se aderentes, aumentam sua granulação, complexidade e capacidade fagocítica. Também apresentam aumento do citoplasma, do número de ribossomos e mitocôndrias e adquirem uma menor taxa de proliferação. No entanto, a concentração de PMA utilizada também pode modular a resposta dos macrófagos para um perfil mais pro-inflamatório (STARR et al., 2018 e CHANPUT et al., 2014).

Aldo et. al (2013) observou que, ao serem cultivadas em baixa densidade, as células THP-1 apresentam-se mais homogêneas, com menor tamanho, e não expressam CD14; nessa situação, o estímulo com PMA não aumenta significativamente essa expressão. Por outro lado, ao serem cultivadas em uma densidade celular elevada e incubadas por um período mais longo, tornam-se mais heterogêneas, com quantidade elevada de células grandes e positivas para CD14. Ao serem tratadas com PMA, estão mais sensíveis ao estímulo, aumentando ainda mais a expressão de CD14. Ainda, é importante ressaltar que diferentes concentrações de PMA e tempos de incubação com esse composto podem afetar esses parâmetros (tamanho, morfologia e expressão de marcadores de superfície, como CD14 e a maturação das THP-1 (STARR et al. 2018), por isso faz-se necessário avaliar as melhores condições em que as células são mantidas e tratadas. Concentrações aumentadas dos estímulos indutores de diferenciação aumentam a expressão de genes que podem levar à polarização de macrófagos e à produção de mediadores pró-inflamatórios, mascarando o resultado de tratamentos experimentais (PARK et al., 2007). Lund et al. (2016) observou que células THP-1 diferenciadas com concentrações mais altas de PMA tiveram a secreção de TNF significativamente elevada, se comparada àquela de células tratadas com concentrações mais baixas, em resposta a estímulos fracos e fortes com LPS. Sendo assim, em modelos *in vitro* de macrófagos, torna-se necessário utilizar uma concentração de PMA suficiente para induzir a diferenciação de células THP-1, sem

que haja a ativação de genes que promovam fenótipo pró-inflamatório. Isso garante a obtenção de um modelo que reflete com mais precisão as condições fisiológicas reais (PARK et al., 2007).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi padronizar condições experimentais para a diferenciação de células THP-1 em macrófagos, determinar a concentração de trabalho dos ácidos PA e DHA padronizar as condições experimentais para utilização do lipopolissacarídeo (LPS) como controle positivo para avaliação da função inflamatória de células THP-1 diferenciadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE CÉLULAS THP-1

Para os experimentos, foram cultivadas células THP-1 (linhagem de monócitos humanos), em meio RPMI 1640 (Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e suplementado com 2mM de glutamina. As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% de umidade, de acordo com as especificações da ATCC (*American Type Culture Collection*), sendo repicadas a cada 2 ou 3 dias, quando a densidade celular atingia entre 0,8x10⁶e 1x10⁶ células/mL.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PMA UTILIZADA PARA A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS THP-1

Considerando que a THP-1 é uma linhagem celular monocítica, a diferenciação dessas células em macrófagos foi necessária para a realização dos experimentos. Portanto, para a realização dos ensaios, as células foram diferenciadas em macrófagos utilizando-se PMA (*phorbol 12-myristate 13- acetate*). As concentrações de PMA testadas foram 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, durante os tempos de 24 e de 48 horas. As concentrações testadas e os intervalos de tempo foram estabelecidos com base na literatura.

4.2.1 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

O ensaio de adesão celular foi realizado utilizando-se o corante cristal violeta, com objetivo de avaliar a proporção de macrófagos aderidos após o tratamento com diferentes concentrações de PMA, em comparação ao controle (células THP-1 não tratadas com o agente diferenciador) (LEE; WARREN, 1987). Neste ensaio, a determinação da absorvância do cristal violeta é diretamente proporcional à quantidade de macrófagos aderidos, uma vez que os mesmos retêm o corante. Desta forma, quanto maior a absorvância, maior a retenção de corante, e maior a adesão celular decorrente da diferenciação com PMA. Além da determinação da absorvância do cristal violeta, a análise da área ocupada por células aderidas em fotos obtidas antes da extração do corante também foi realizada.

Para este ensaio, foi preparada uma solução de PMA (Sigma-Aldrich) em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 1 µg/mL, utilizada para preparar concentrações de 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL por diluição em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado conforme descrito no item 4.1.

A padronização da concentração de PMA foi realizada utilizando-se placas de 24 poços, uma para o tratamento de 24 horas e outra para o de 48 horas. Para ambos os tempos, foram realizadas triplicatas das concentrações, do controle (THP-1 sem tratamento com PMA) e do branco da amostra (somente meio de cultura). Em cada poço foram plaqueadas $0,2 \times 10^6$ células THP-1 em um volume total de 250 µL de meio e PMA. Para o ensaio de adesão foram realizados três experimentos independentes.

4.2.1.1 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DE CRISTAL VIOLETA

Após os tempos de incubação, os poços foram corados com uma solução de cristal violeta numa concentração de 0,2% em PBS (*phosphate buffer solution*). Primeiramente, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com PBS para retirar o meio de cultura excedente, bem como possíveis células que não aderiram. A seguir, as células aderidas foram fixadas com metanol 70% (1 mL por poço) durante 10 minutos, sendo os poços novamente lavados com PBS. O cristal violeta foi adicionado aos poços (400 µL por poço) durante 5 minutos para corar as células sendo, posteriormente, lavado com água destilada. Nos poços correspondentes ao “branco” foi adicionado apenas o cristal violeta, sendo estes processados da mesma forma que os poços que continham células, ou seja, lavados com água destilada após a exposição ao corante por 5 minutos. Para extrair o corante incorporado pelas células aderidas e assim determinar as absorbâncias, 200 µL de ácido acético foram adicionados aos poços, sendo o sobrenadante transferido para uma placa de 96 poços, cuja absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm.

4.2.1.2 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA OCUPADA PELAS CÉLULAS ADERIDAS

Após a coloração com cristal violeta e antes da extração do corante retido pelas células, foram obtidas três fotos de cada poço em microscópio óptico invertido, com aumento de 40x, totalizando 27 fotos por concentração de PMA em cada tempo avaliado. As fotos foram analisadas utilizando-se o programa *ImageJ* e a avaliação da área ocupada pelas células aderidas foi realizada por meio da densitometria das imagens pela ferramenta *AnalyzeParticles*. Os resultados da densitometria foram expressos em *pixels*.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO DOS ÁCIDOS GRAXOS

A padronização da concentração de trabalho dos ácidos graxos foi realizada com o objetivo de se determinar concentrações de PA e de DHA não citotóxicas para células THP-1 diferenciadas. A concentração de trabalho escolhida, foi a maior concentração que garantiu, no mínimo, 80% de viabilidade celular, determinada pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina].

4.3.1 PLAQUEAMENTO E TRATAMENTO COM OS ÁCIDOS GRAXOS

As células THP-1 foram plaqueadas em uma placa de 96 poços na quantidade de 50×10^3 por poço em 300 μL de meio, sendo diferenciadas com 5 ng/mL de PMA durante 48 horas (condições previamente padronizadas). Após esse período, os poços foram lavados com PBS e as células tratadas com ácidos graxos, em um volume final de 200 μL por poço. As concentrações escolhidas para o tratamento com PA foram de 50 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM , 175 μM e 200 μM e de 10 μM , 25 μM , 50 μM , 60 μM , 80 μM e 100 μM para o tratamento com DHA, sendo as células expostas aos ácidos graxos por 24 e 48 horas. O controle foi tratado com o veículo de diluição de ácidos graxos (etanol a 0,29%).

Os ensaios foram realizados triplicatas. As concentrações testadas e os intervalos de tempo foram estabelecidos com base na literatura.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE PELO ENSAIO DE MTT

Após os intervalos de tratamento, os poços foram lavados com PBS e uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio RPMI foi adicionada aos poços em um volume de 100 µL. Após incubação por 2 horas a 37°C e 5% CO₂, a solução de MTT foi removida e adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) para solubilização do sal de formazana formado. As placas foram agitadas por 5 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (equipamento) em 570 nm. Os resultados de viabilidade foram expressos em relação ao controle em unidades relativas, ao qual foi atribuída, arbitrariamente, uma viabilidade de 100%, considerando células sem interferência dos ácidos graxos.

4.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA UTILIZAÇÃO DE LPS COMO CONTROLE POSITIVO PARA AVALIAÇÃO DE CÉLULAS THP-1 DIFERENCIADAS

Para padronização das condições experimentais para a utilização de LPS como controle positivo, ou seja, ativador de macrófagos, células THP-1 foram plaqueadas em duplicatas, nas quantidades de $0,25 \times 10^6$, $0,75 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 de células por poço, em placas de 24 poços e tratadas com 500 ng/mL, 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL e 2,5 µg/mL de LPS. As células RAW 264.7, macrófagos de linhagem murina, também foram plaqueadas nas mesmas condições, porém tratadas com 1,25 e 2,5 µg/mL de LPS e utilizadas como um controle positivo de ativação. A ativação de macrófagos derivados da diferenciação de células THP-1 e dos macrófagos murinos, após a exposição ao LPS pelo período de 48 horas, foi avaliada por meio da coleta do sobrenadante, utilizado para a quantificação de NO pela metodologia de Griess.

4.5 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A mensuração do óxido nítrico, foi realizada em células THP-1 tratadas com PMA, bem como células THP-1 diferenciadas em macrófagos e estimuladas com LPS. Dessa forma, para células THP-1 procedeu-se da mesma forma descrita no item 4.4 desse trabalho. Já para a mensuração do NO após o tratamento das células THP-1 com PMA, as mesmas foram plaqueadas em placas de 24 poços, na quantidade de

1×10^6 células por poço e expostas ao agente diferenciador pelo tempo e concentrações previamente descritas no item 4.2.1 deste trabalho, referente a execução dos ensaios de adesão. Após os tempos de incubação com os compostos (LPS ou PMA), o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a quantificação do NO, realizada seguindo-se o protocolo estabelecido por Griess(1879).

Para execução desta técnica, utilizou-se um reagente de trabalho preparado a partir da mistura, na proporção de 1:1, de uma solução de sulfanilamida 1% (em H_3PO_4 5% v/v água milliQ) e outra de α -naftiletilenodiamina 0,1% em água milliQ. Este reagente foi adicionado às amostras e aos padrões no volume de 100 μL . Após a leitura da absorbância em 550 nm, os resultados foram expressos em μM , sendo obtidos a partir de uma curva-padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) com concentrações entre 2,5 e 80 μM .

Para a execução do ensaio de produção de NO foram realizados três experimentos independentes. Em cada experimento, todas as concentrações de PMA e LPS utilizadas, foram testadas em triplicata.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média (DP), sendo analisados por teste *One-Way* ANOVA, seguido do *post-test* Tukey ou ANOVA 2-way, por meio do programa estatístico *GraphPad* Software, com $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PMA PARA DIFERENCIAR CÉLULAS THP-1 EM MACRÓFAGOS

Para a padronização da concentração de PMA a ser utilizada para diferenciar células THP-1, dois parâmetros foram levados em consideração: adesão celular e produção de óxido nítrico, o qual é reflexo da ativação de macrófagos.

Concentrações de PMA menores do que 100 ng/mL têm sido descritas como mais eficientes para a diferenciação, por deixarem as células com maior viabilidade e mais responsivas a estímulos inflamatórios (MAEß et al., 2018). Dessa forma, as concentrações escolhidas para a execução de tal padronização foram baseadas no estudo de Park et al. (2007). O objetivo foi determinar uma concentração de PMA que promovesse a diferenciação a macrófagos de forma eficiente, sem levar ao aumento significativo da expressão de genes pró-inflamatórios (como o NO), ou seja, sem ocorrer a ativação dos mesmos.

Inicialmente, foi avaliada a adesão celular no tratamento de células THP-1 com PMA em concentrações que variaram de 2,5 ng/mL a 100 ng/mL, nos tempos de 24 e 48 horas. Para isso, foi utilizada a metodologia do cristal violeta, na qual foi avaliada tanto a incorporação desse corante por células aderentes, como a área ocupada pelas células aderidas.

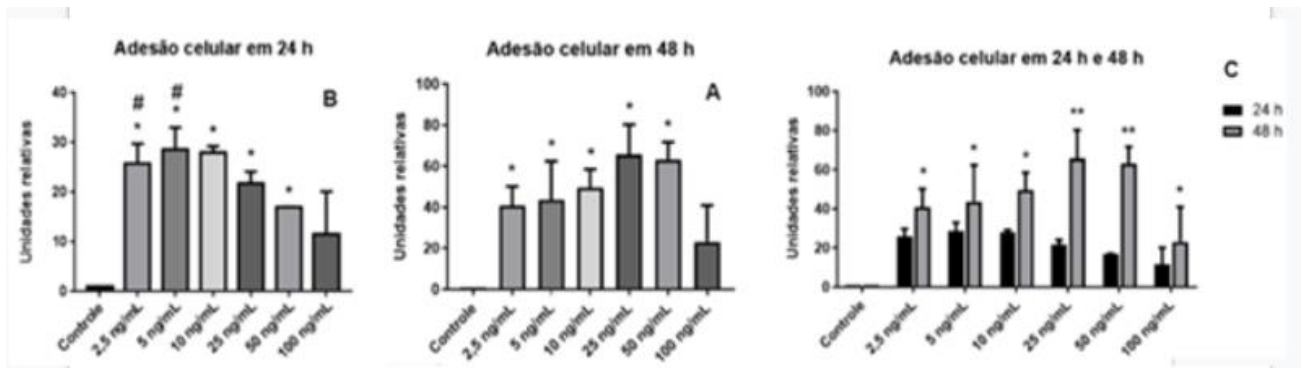


FIGURA 1. Adesão das células THP-1 com diferentes concentrações de PMA por meio da avaliação da incorporação do cristal violeta. (A) Adesão de células THP-1 tratadas com PMA no tempo de 24 horas. (B) Adesão de células THP-1 tratadas com PMA no tempo de 48 horas. (C) Comparação entre a adesão de células THP-1 tratadas com PMA nos tempos de 24 e 48 horas. Valores representam média \pm DP de triplicatas de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ quando comparado à concentração de 100 ng/mL de PMA.

De modo geral, foi observado maior aumento da adesão celular no tempo de 48 horas em comparação ao de 24 horas, em todas as concentrações avaliadas, tanto pelos resultados obtidos pela determinação da incorporação do cristal violeta, quanto pela quantificação da área ocupada (Figura 1C e Figura 2C).

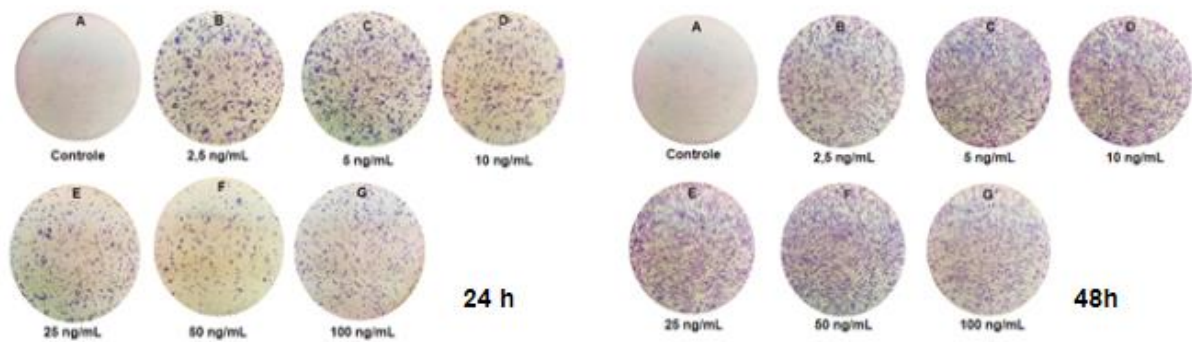


FIGURA 2. Fotos representativas obtidas utilizando microscópio óptico invertido, no aumento de 40x, das células THP-1 aderidas e coradas com Cristal Violeta após tratamento de 24 e 48 horas com diferentes concentrações de PMA.

As fotos representativas indicadas na Figura 2 também evidenciam a maior adesão celular ocorrida no tempo de 48 horas, indicando que este tempo se mostrou mais efetivo no sentido de promover a diferenciação das células THP-1 em macrófagos, devido ao maior tempo de exposição ao PMA.

Ao se comparar a adesão celular entre as diferentes concentrações de PMA no mesmo tempo de tratamento, observou-se que, tanto em 24 quanto em 48 horas, a concentração de 100 ng/ml levou à menor adesão, indicando menor ocorrência de diferenciação (Figuras 1A e B, Figura 2). Dessa forma, independentemente do tempo de tratamento, essa não seria a concentração de escolha para diferenciar células THP-1 em macrófagos. Ainda, em ambos os tempos de incubação, a avaliação da incorporação do cristal violeta e da área ocupada por células aderidas evidenciou que as concentrações de 2,5 ng/mL a 50 ng/mL promoveram adesão celular significativamente maior do que a observada no controle (Figuras 1A e B, Figura 2, Figura 3A e B).

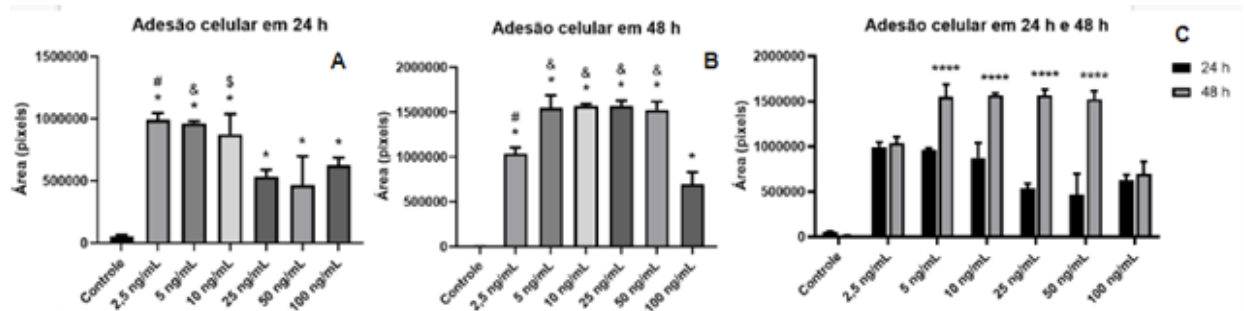


FIGURA 3. Adesão das células THP-1 com diferentes concentrações de PMA por meio da avaliação da área ocupada pelos macrófagos em imagens obtidas a partir das culturas celulares. (A) Adesão de células THP-1 tratadas com PMA no tempo de 24 horas. (B) Adesão de células THP-1 tratadas com PMA no tempo de 48 horas. (C) Comparação entre a adesão de células THP-1 tratadas com PMA nos tempos de 24 e 48 horas. Valores representam média \pm DP de triplicatas de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ quando comparado às concentrações de 25, 50 e 100 ng/mL de PMA no tempo de 24 horas e quando comparado às concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 ng/mL de PMA no tempo de 48 horas; & $p < 0,05$ quando comparado às concentrações de 25 e 50 ng/mL de PMA no tempo de 24 horas e quando comparado à concentração de 100 ng/mL de PMA no tempo de 48 horas; § $p < 0,05$ quando comparado à concentração de 50 ng/mL de PMA; **** $p < 0,0001$ quando comparado ao tempo de 24 horas.

A análise da incorporação do cristal violeta não mostrou diferenças significativas entre as concentrações de 2,5 ng/mL a 50 ng/mL em ambos os tempos avaliados (embora no tempo de 24 horas, as concentrações de 2,5 ng/mL e 5 ng/mL tenham apresentado absorvância significativamente superior à apresentada pela concentração de 100 ng/mL) (Figura 1A e B). Já a análise da área ocupada pelas células evidenciou aumento significativo da adesão nas concentrações de 2,5 ng/mL a 10 ng/mL em relação às demais no tempo de 24 horas (Figura 3A) e das concentrações de 5 ng/mL a 50 ng/mL em relação às concentrações de 2,5 ng/mL e

de 100 ng/mL no tempo de 48 horas (Figura 3B), corroborando com os resultados da incorporação do cristal violeta, indicando que, quanto maior a quantidade de células aderidas, maior a área ocupada.

Analisando-se conjuntamente os resultados obtidos pela avaliação da incorporação do cristal violeta e pela análise da área ocupada pelas células aderidas, o tempo de 48 horas se mostrou mais efetivo para promover a diferenciação de células THP-1 em macrófagos utilizando PMA, sendo as concentrações de 5 ng/mL e 10 ng/mL as que apresentaram resultados mais consistentes em ambos os tempos e análises.

No presente estudo, é importante que a diferenciação das células THP-1 origine macrófagos que apresentem um estado de ativação mínima, visto que se objetiva avaliar a modulação inflamatória exercida pelos AGs saturados e ômega-3. No entanto, sabendo-se que o tratamento com PMA pode também induzir o aumento da expressão de genes pró inflamatórios, e consequente ativação, foi determinada, inicialmente, a produção de NO para avaliar o estado de ativação dos macrófagos decorrente do tratamento com PMA. O NO é um marcador de polarização e ativação de macrófagos para um perfil pro-inflamatório, sendo um dos mediadores citotóxicos de células imunes efectoras ativadas e constituindo uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune (DUSSE et al., 2003). O ensaio utilizado foi o método de Griess (1879), no qual o reagente de Griess, converte todo o NO e nitrato presentes na amostra, em nitrito. O nitrito, por sua vez, reage com a α -naftiletilenodiamina, formando um composto de coloração avermelhada (RAMOS et al., 2006), cuja absorbância é determinada por espectrofotometria a 540 nm.

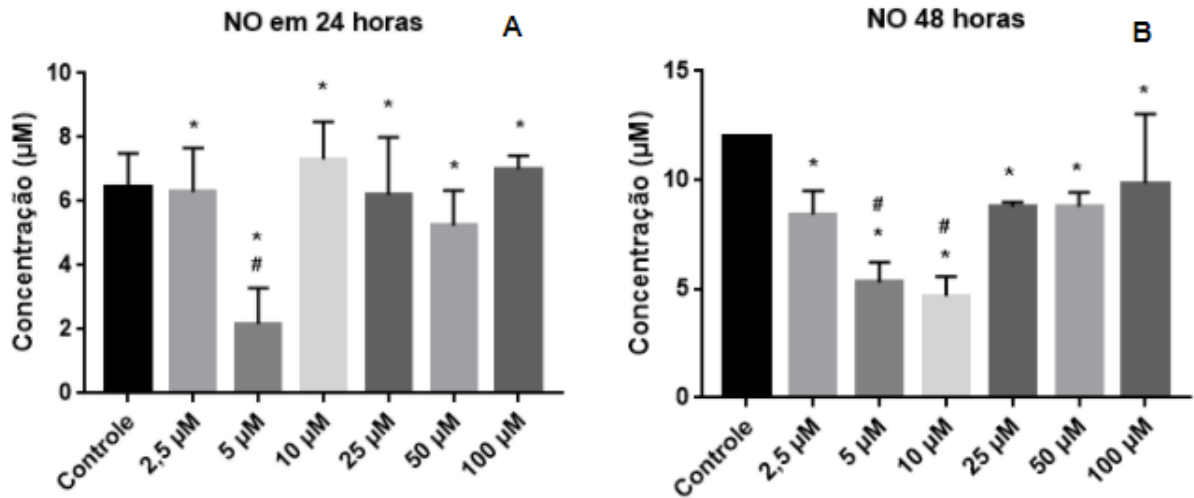


FIGURA 4. Produção de NO (μM) por macrófagos diferenciados com PMA. Produção de NO por macrófagos obtidos por diferenciação de células THP-1 com diferentes concentrações de PMA por 24 (A) e por 48 horas (B). Valores representam média \pm DP de triplicatas de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ quando comparado à concentração de 5 μM no tempo de 24 horas e quando comparado às concentrações de 5 μM e 10 μM no tempo de 48 horas.

Os resultados obtidos demonstraram que após 24 horas de tratamento com o PMA, a concentração de 5 ng/mL foi a que induziu a menor produção de NO pelos macrófagos (Figura 4A). Após 48 horas de tratamento, as concentrações de 5 ng/mL e 10 ng/mL de PMA apresentaram uma tendência relacionada a menor produção de NO (11,43 μM e 10,80 μM , respectivamente) em comparação ao grupo controle (18,13 μM) (Figura 4B).

Avaliando-se conjuntamente os resultados obtidos nos ensaios de adesão com cristal violeta e produção de NO, as concentrações de PMA de 5 ng/mL e 10 ng/mL apresentaram capacidade de diferenciar as células THP-1 em macrófagos levando à menor ativação inflamatória. Dessa forma, a concentração de 5 ng/mL foi a selecionada para dar continuidade aos experimentos, pois foi a menor concentração de PMA que resultou nos efeitos observados.

5.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TRABALHO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Como mencionado anteriormente, a padronização da concentração de trabalho dos ácidos graxos PA e DHA foi realizada por meio do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

O MTT é um ensaio colorimétrico, que tem como objetivo avaliar indiretamente a viabilidade das células por meio da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. O MTT é um sal de coloração amarela solúvel em água que, em contato com as células viáveis, é reduzido à formazana na mitocôndria, um composto de coloração roxa e insolúvel em água. (MAGALHÃES et al., 2018; ASLANTÜRK, 2018). Sendo assim, em algumas condições experimentais, quanto maior a absorvância do sal, maior a viabilidade celular. A absorvância da formazana é então determinada por leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

Inicialmente, a padronização foi feita com concentrações de 25 μM , a 300 μM para o PA e de 5 μM a 100 μM para o DHA. Como mencionado anteriormente, para essa padronização, buscou-se determinar a maior concentração de trabalho dos ácidos graxos que garantisse, uma viabilidade celular de trabalho escolhida de, pelo menos, 80% em relação ao controle (THP-1 diferenciada e não tratada com AGs). Essa viabilidade mínima garante que a concentração de trabalho escolhida mantém a integridade da célula, permitindo que os parâmetros escolhidos possam ser avaliados sem a interferência do fator citotoxicidade.

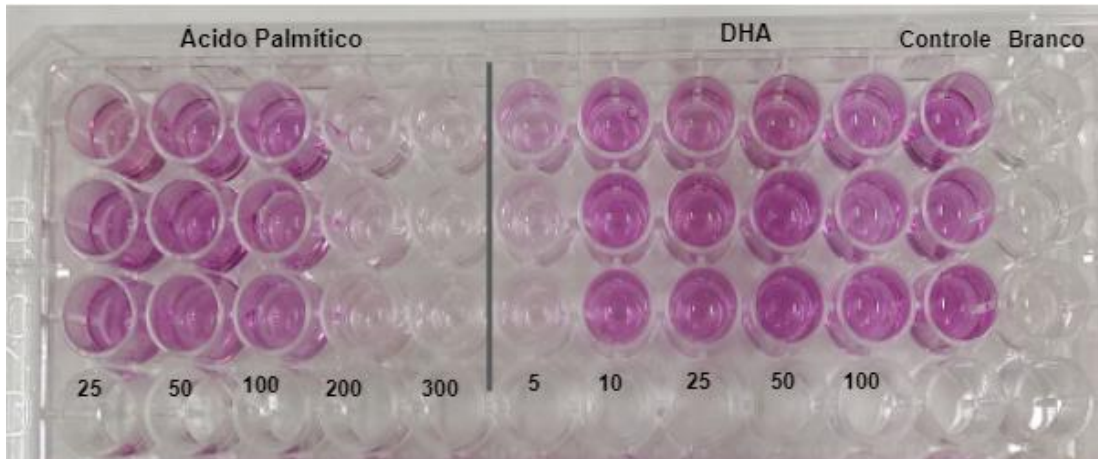


FIGURA 5. Ensaio de MTT realizado com macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 tratadas com os ácidos graxos em concentrações entre 25 e 300 μM para o Ácido Palmítico e entre 5 e 100 μM para o DHA, no tempo de 48 horas.

Após a execução dos ensaios pilotos, verificou-se uma variação grande na absorbância apresentada pelas concentrações de 100 μM e 200 μM para o PA e variação entre as concentrações de 50 μM a 100 μM para o DHA (Figura 5). Sendo assim, optou-se por incluir concentrações intermediárias (de 125 μM , 150 μM e 175 μM para o PA e de 60 μM e 80 μM para o DHA), diminuindo o intervalo entre as concentrações. Além disso, as concentrações de 25 μM para o PA e de 5 μM para o DHA foram excluídas por serem muito baixas e não terem induzido citotoxicidade, enquanto a de 300 μM para o PA foi retirada, uma vez que promoveu morte significativa dos macrófagos, evidenciada pela baixa absorbância após a realização do teste do MTT. Como mencionado na metodologia, o controle negativo do experimento, foi tratado com etanol. Inicialmente, utilizou-se concentrações de etanol proporcionais às utilizadas na diluição do PA (escolhido por apresentar as diluições com as maiores concentrações de etanol em relação ao DHA), com o objetivo de observar uma possível influência do mesmo na viabilidade celular, mascarando o real efeito dos ácidos graxos. No entanto, após alguns experimentos, foi observada uma variação aleatória entre os controles, não respeitando a proporcionalidade esperada com o aumento da concentração do diluente, uma vez que se caso o etanol influenciasse de forma significativa na viabilidade celular, seria observada diminuição da absorbância da formazana, com o aumento da concentração do mesmo. Dessa forma, optou-se por realizar os experimentos de padronização da

concentração de trabalho dos AGs utilizando como controle negativo a porcentagem de etanol utilizada na concentração de 200 μM de PA (0,19% de etanol). Após os experimentos pilotos para estabelecimento das concentrações de AGs a serem testadas e da porcentagem de etanol utilizada para o tratamento do controle negativo, células THP-1 foram plaqueadas e diferenciadas conforme citado anteriormente. Após esse período, as células foram tratadas com as PA (50 μM , 100 μM , 125 μM , 150 μM , 175 μM , 200 μM) e DHA (10 μM , 25 μM , 50 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM) por 48 horas, sendo realizado o ensaio do MTT conforme descrito na metodologia.

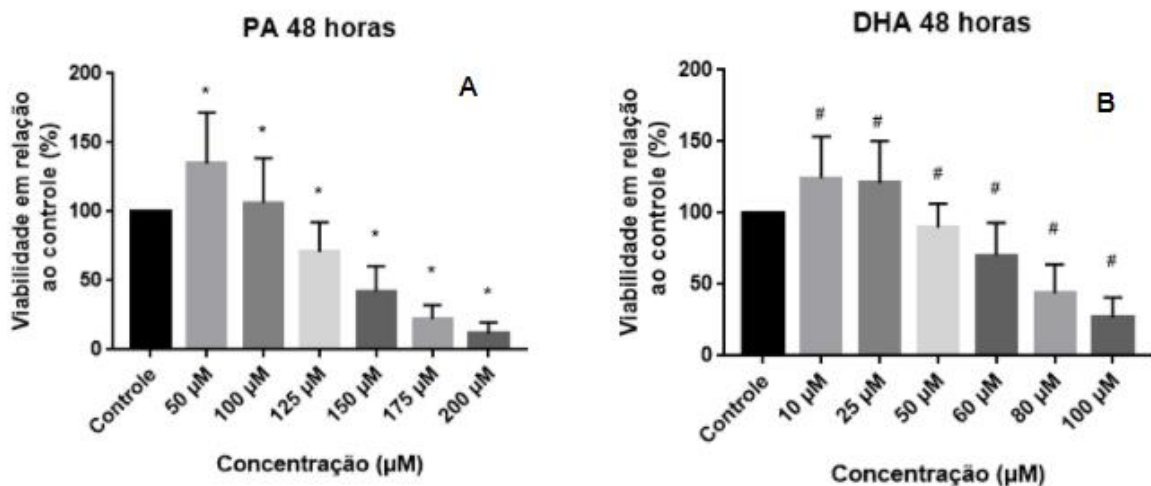


FIGURA 6. Viabilidade celular de macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 tratadas com diferentes concentrações de PA (A) e DHA (B), em relação ao controle (100%), no tempo de 48 horas. * $p < 0,0001$; # $p > 0,001$.

Os resultados evidenciaram que, de modo geral, o aumento da concentração de ambos os AGs, resultou na diminuição da viabilidade celular (Figura 6 A e B). Em relação ao PA, a maior concentração que manteve a viabilidade celular acima de 80% após 48 horas de tratamento foi de 100 μM . Em relação ao DHA, essa concentração foi de 50 μM (Figura 6 B).

Após a avaliação da citotoxicidade decorrente do tratamento com AGs durante 48 horas, as mesmas condições de plaqueamento e tratamento foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade no tempo de 24 horas.

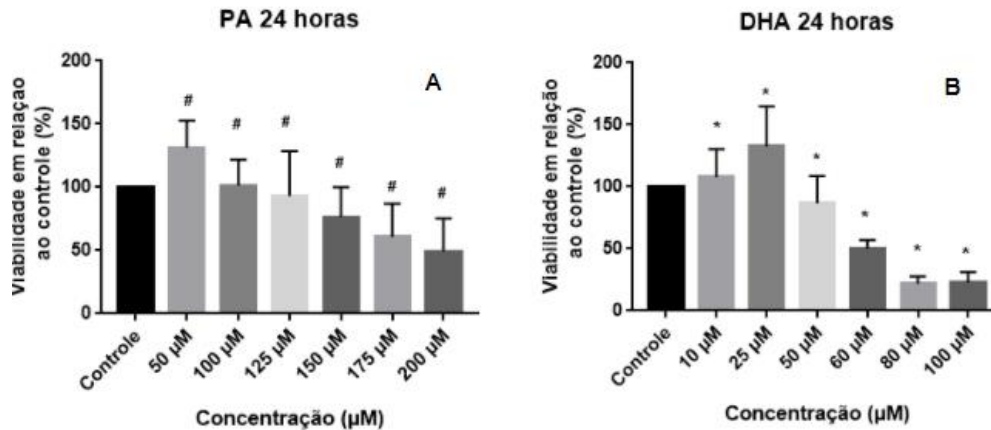


FIGURA 7. Viabilidade celular de macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 tratadas com diferentes concentrações de PA (A) e DHA (B), em relação ao controle (100%), no tempo de 24 horas. * $p < 0,001$; # $p < 0,01$

Os resultados evidenciaram que as maiores concentrações de PA e DHA que mantiveram a viabilidade celular acima de 80% após 24 horas de tratamento foram 125 µM e 50 µM, respectivamente (Figura 7A e B).

Após a repetição dos ensaios para avaliação da citotoxicidade induzida pelos AGs nos tempos de 24 e 48 horas, observou-se a ocorrência de alta variabilidade, que se refletiu em um grande desvio padrão nos resultados. A alta variabilidade intra e inter experimental pode ser explicada por dois motivos: 1-pode haver diferença na diferenciação de células THP-1 com PMA em cada poço, sendo que nem todas as células plaqueadas de fato se diferenciam em macrófagos e essa proporção pode alterar de replicata para replicata entre os experimentos, afetando o resultado dos ensaios do MTT; 2- constatou-se que a passagem das células THP-1 interferia no seu comportamento frente à diferenciação com PMA e ao tratamento com AGs (quanto maior o número da passagem na qual a célula se encontrava, maior a variabilidade experimental).

Além dos fatores experimentais que afetaram a reprodutibilidade dos ensaios, foi observado que as absorbâncias determinadas para algumas concentrações de AGs se mostraram maiores do que a do controle (considerado como apresentando 100% de viabilidade). Esse aumento de absorbância poderia ser interpretado como um aumento do número de células, o que seria equivocado, visto que a THP-1 após diferenciada não prolifera. Dessa forma, uma das explicações possíveis seria a de que, pelo fato de o MTT ser um método que avalia a viabilidade celular pela função mitocondrial, tratamentos com compostos que aumentariam essa função poderiam

resultar em maior formação de formazana e, conseqüentemente, maior absorbância. No entanto, essa hipótese deve ser verificada.

Após analisar os dados em conjunto e tendo em vista todas as fontes de variação experimental relacionadas, é possível afirmar que, em ambos os tempos de experimento, para os dois ácidos graxos utilizados, os resultados observados são preliminares, sendo necessários mais experimentos para confirmar os resultados obtidos.

5.3 PADRONIZAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE LPS COMO INDICADOR DE ESTIMULAÇÃO DE THP-1

Os Lipopolissacarídeos (LPS) são uma família de glicolípídeos tóxicos presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas (por exemplo, *Neisseria spp*, *Helicobacter pylori* e *Haemophilus influenzae*) e excelentes estimuladores e moduladores da resposta imunológica por meio de monócitos, macrófagos e células dendríticas. O LPS é composto por uma porção de poli ou oligossacarídeos ligados covalentemente a um componente lipídico. Diferenças na estrutura da porção sacarídica contribuem para a virulência da bactéria (MORAN, 1996; ABBAS, 2006). Por ser uma endotoxina que provoca resposta inflamatória, é um indicador de ativação e modulação de macrófagos amplamente usado em ensaios imunológicos, funcionando como um controle positivo. As células THP-1 diferenciadas, por se tratar de macrófagos, são fortemente responsivas ao LPS; portanto, nesse estudo, optou-se pelo seu uso como indicador da atividade dessas células. Para tanto, foi necessária a padronização das condições de tratamento com LPS, sendo o NO o mediador escolhido para avaliar a ativação dos macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1. Para esses experimentos, as células THP-1 diferenciadas com PMA foram estimuladas com LPS durante 48 horas, que é considerado o tempo no qual ocorre a produção máxima de NO por macrófagos (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

O primeiro ensaio foi realizado utilizando células THP-1 e células da linhagem RAW 264.7. A RAW 264.7 é uma linhagem de macrófagos murinos e, portanto, são células aderentes que não necessitam de diferenciação com PMA. Essas células são consideradas excelentes produtoras de NO, sendo utilizadas como controle

positivo, para fins de comparação com os resultados obtidos após a diferenciação de células THP-1.

| Concentração de LPS | Absorbância | Produção de NO (μM) |
|----------------------|-------------|----------------------------------|
| Controle | 0,097 | 4,138 |
| 500 ng/mL | 0,084 | 2,718 |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | 0,083 | 2,609 |
| 1,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,0825 | 2,555 |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | 0,0835 | 2,664 |
| 2,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,096 | 4,028 |

TABELA 1. Produção de NO por macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 estimuladas com diferentes concentrações de LPS.

| Concentração de LPS | Absorbância | Concentração de NO (μM) |
|----------------------|-------------|--------------------------------------|
| Controle | 0,0985 | 4,301 |
| 500 ng/mL | 0,099 | 4,356 |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | 0,322 | 28,701 |
| 1,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,106 | 5,120 |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | 0,129 | 7,631 |
| 2,5 $\mu\text{g/mL}$ | 0,146 | 9,487 |

TABELA 2. Produção de NO por células RAW 264.7 estimuladas com diferentes concentrações de LPS.

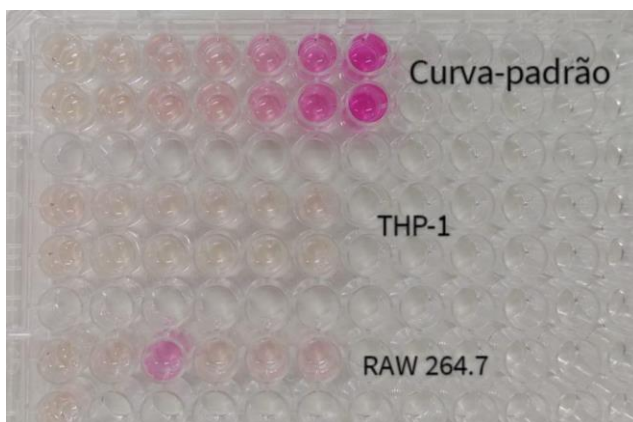


FIGURA 8. Ensaio de Griess em macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 e Raw 264.7 tratadas com LPS nas concentrações de 500 ng/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Como observado na Tabela 1 e na Figura 8, a concentração de NO produzida pelos macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 em todas as concentrações de LPS utilizadas, foi baixa (entre 2,5 e 4 μM), se comparada com a produção de NO observada nas células RAW 264.7 estimuladas com as mesmas concentrações de LPS (Tabela 2 e Figura 8), indicando que não houve ativação evidente com nenhuma das concentrações de LPS testadas. É possível observar um aumento abrupto na produção de NO pela RAW na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, o que pode ser interpretado como um erro experimental, visto que não se observou uma tendência de aumento ou diminuição conforme as concentrações de LPS aumentaram.

A primeira hipótese a partir desse resultado foi de que o número de células utilizado no experimento foi pequeno. Dessa forma, repetiu-se o experimento com o plaqueamento apenas das células THP-1, nas quantidades de $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células por poço (em duplicata), utilizando-se uma única concentração de LPS (2,5 $\mu\text{g/mL}$).

| 1,0x10 ⁶ células | Absorbância | Concentração NO (μM) |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|
| Controle | 0,069 | 1,279 |
| LPS (2,5 $\mu\text{g/mL}$) | 0,070 | 1,375 |

TABELA 3. Produção de NO por macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1. Células THP-1 foram plaqueadas na quantidade de $1,0 \times 10^6$ células por poço e estimuladas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS.

| 0,5x10 ⁶ células | Absorbância | Concentração NO (μM) |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|
| Controle | 0,068 | 1,183 |
| LPS (2,5 $\mu\text{g/mL}$) | 0,078 | 2,144 |

TABELA 4. Produção de NO por macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1. Células THP-1 foram plaqueadas na quantidade de $0,5 \times 10^6$ células por poço e estimuladas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS.



FIGURA 9. Ensaio de Griess realizado com o sobrenadante obtido após o tratamento de macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 com 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS. Para a execução desse ensaio, células THP-1 foram plaqueadas nas quantidades de $1,0 \times 10^6$ e $0,5 \times 10^6$ células por poço.

O resultado obtido no segundo ensaio indicou que a ausência da produção de NO não estava relacionada à quantidade de células utilizadas no experimento (Tabelas 3 e 4, Figura 9). Dessa forma, outra hipótese levantada foi a estabilidade do LPS, visto que estava sendo utilizada uma solução de LPS previamente diluída e estocada. Sendo assim, uma nova solução de LPS foi preparada. Analisando-se a literatura, também foram encontrados diversos protocolos de diferenciação de células THP-1 com PMA, levantando-se a hipótese de que essas diferentes condições experimentais pudessem interferir na forma como as células reagem aos estímulos (LUND *et al.*, 2016). Em estudo realizado por Chanput *et al.* 2013, após a diferenciação com 100 ng/mL de PMA durante 48 horas, as células foram mantidas apenas em meio RPMI por 24 horas para possibilitar o retorno ao estado de ativação basal. Em um outro estudo, o estímulo das células THP-1 foi realizado com e sem a diferenciação com PMA, a fim de se verificar o efeito deste na produção de mediadores inflamatórios em decorrência de um estímulo antigênico (BAQUI *et al.*, 1999).

Assim, um terceiro ensaio foi realizado, no qual apenas células THP-1 foram plaqueadas, em duplicatas, nas quantidades de $0,5 \times 10^6$, $0,75 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ nas seguintes condições: 1- células THP-1 não diferenciadas com PMA e tratadas com 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS logo após o plaqueamento; 2- células THP-1 diferenciada por 48 horas com 5 ng/mL de PMA e tratadas logo em seguida com 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS; 3-

células THP-1 diferenciadas com 5 ng/mL de PMA por 48 horas, mantidas 24 horas em meio RPMI para manutenção do estado basal e, logo após, tratadas com 2,5 µg/mL de LPS.

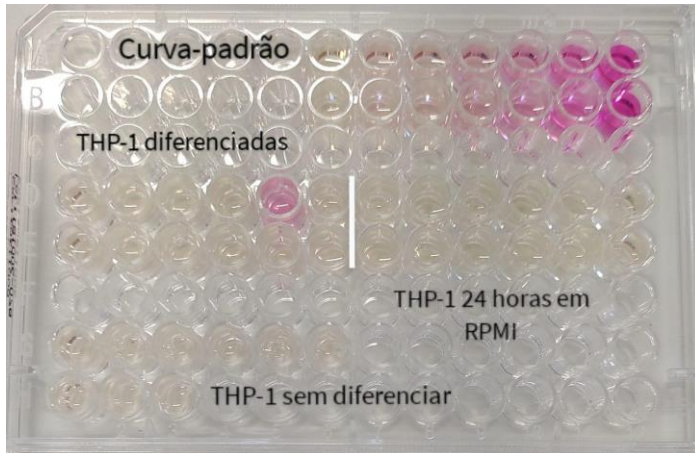


FIGURA 10. Ensaio de Griess em células THP-1 plaqueadas nas quantidades de $0,5 \times 10^6$, $0,75 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ células por poço, nas seguintes condições: células THP-1 não diferenciadas com PMA e tratadas com 2,5 µg/mL de LPS logo após o plaqueamento; células THP-1 diferenciadas por 48 horas com 5 ng/mL de PMA e tratadas logo em seguida com 2,5 µg/mL de LPS; células THP-1 diferenciadas com 5 ng/mL de PMA por 48 horas, mantidas 24 horas em meio RPMI e, logo após, tratadas com 2,5 µg/mL de LPS.

Como é possível observar na Figura 10, não houve produção de NO em nenhuma das condições testadas. Todos os resultados obtidos sugerem que macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 não produzem NO em quantidades detectáveis pelo método de Griess. Nesse sentido, uma busca na literatura mostrou que células THP-1 diferenciadas em macrófagos, diferentemente da RAW 264.7, produzem a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NO de maneira pouco detectável em resposta a estímulos inflamatórios devido a uma regulação epigenética no sítio da transcrição do gene da iNOS, o que leva ao seu silenciamento (OZLEYEN et al., 2021; GROSS et al., 2014). Sendo assim, o NO não seria um mediador de escolha para indicar a ativação de macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1.

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos até então com a resposta de células RAW 264.7 ao estímulo com LPS para testar a hipótese de que as células THP-1 não produzem uma quantidade detectável de NO pelo método de Griess, um último experimento foi realizado com células RAW 264.7, plaqueadas nas

quantidades de $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ por poço e tratadas LPS nas concentrações de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (com a solução estoque e recém-preparada) e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (com a solução recém-preparada).

| 1 milhão de células | | | | | |
|---------------------|------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Controle 1 | Controle 2 | LPS1- 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS2- 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (novo) |
| | 0,059 | 0,056 | 0,228 | 0,182 | 0,206 |
| | 0,055 | 0,05 | 0,198 | 0,195 | 0,201 |
| Média | 0,057 | 0,053 | 0,213 | 0,189 | 0,204 |
| NO | 0,541 | 0,174 | 14,853 | 12,606 | 13,982 |
| 500 mil células | | | | | |
| | Controle | LPS 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (antigo) | |
| | 0,059 | 0,195 | 0,147 | 0,328 | |
| | 0,053 | 0,180 | 0,143 | 0,283 | |
| Média | 0,056 | 0,188 | 0,145 | 0,306 | |
| NO | 0,450 | 12,514 | 8,615 | 23,339 | |
| 250 mil células | | | | | |
| | Controle | LPS 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (novo) | LPS 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (antigo) | |
| | 0,070 | 0,445 | 0,353 | 0,523 | |
| | 0,049 | - | 0,285 | - | |
| Média | 0,060 | 0,445 | 0,319 | 0,523 | |
| NO | 0,771 | 36,138 | 24,578 | 43,294 | |

TABELA 5. Produção de NO por células RAW 264.7 plaqueadas nas quantidades de $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 células por poço e estimuladas com 1,25 ou 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de soluções novas e antigas de LPS.

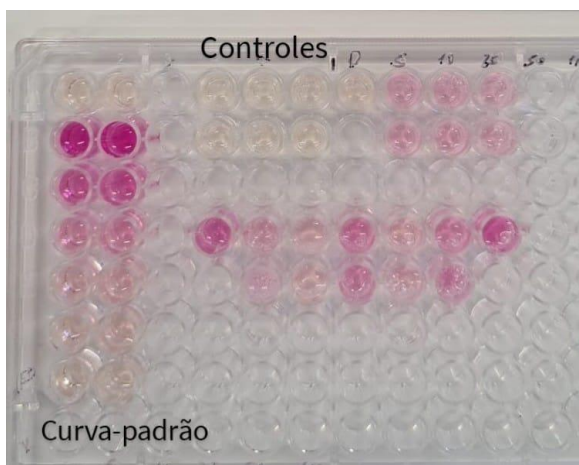


FIGURA 11. Ensaio de Griess em células RAW 264.7 plaqueadas nas quantidades de $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 células por poço e estimuladas com 1,25 ou 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de soluções novas e antigas de LPS

De acordo com a Tabela 5 e a Figura 11, é possível observar aumento na quantidade de NO produzido após estímulo com ambas as soluções de LPS em ambas as concentrações. Todos esses resultados em conjunto confirmam o que está descrito na literatura e evidenciam que é necessário se buscar outros mediadores inflamatórios produzidos por células THP-1 diferenciadas com PMA a fim de se avaliar sua ativação em decorrência de um estímulo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente projeto teve como objetivo principal padronizar a diferenciação de células THP-1 em macrófagos utilizando PMA, bem como as condições de trabalho para o tratamento de tais macrófagos com os ácidos graxos palmítico e DHA, a fim de avaliar a influência do estado de ativação dos macrófagos na sua interação com células tumorais.

Com relação aos ensaios de adesão, foi possível observar que a concentração de 5 ng/mL de PMA, durante o período de 48 horas foi eficiente para promover a diferenciação das células THP-1 em macrófagos. No entanto, a ativação resultante do tratamento com PMA deve ser confirmada por outro mediador inflamatório que não o NO, visto que os resultados obtidos na padronização das condições experimentais para utilização do LPS como controle positivo de estimulação mostraram que a produção de NO por células THP-1 diferenciadas é baixa ou inexistente pelo método utilizado.

Os resultados obtidos no ensaio do MTT mostraram que a concentração de escolha para o tratamento de macrófagos provenientes da diferenciação de células THP-1 com o ácido palmítico seria de 125 e de 100 μ M no tempo de 24 e de 48 horas, respectivamente. Em relação ao DHA, a concentração de escolha para o tratamento nos tempos de 24 e 48 horas, seria a de 50 μ M. No entanto, devido a diversos fatores que influenciaram na variabilidade experimental, estes resultados foram considerados preliminares, sendo necessários novos experimentos para sua confirmação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia: Celular e Molecular*. 9 ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2019.
- ALDO, P. B.; CRAVEIRO, V.; GULLER, S.; MOR, G. Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *American Journal of Reproductive Immunology*, New Haven, v. 70, n. 1, p. 80–86, abr. 2013.
- AMEMORI, S. et al. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Saga, v. 292, n.3, p. 923–929, mar. 2007.
- ASLANTÜRK, O. S. *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. IntechOpen, Turkey, dez. 2017.
- AVGERINOS, K. I.; SPYROU, N.; MANTZOROS, C. S.; DALAMAGA, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism Clinical and Experimental*, Athens, v. 92, p. 121-135, mar. 2019.
- BUI, T. M.; WIESOLEK, H. L.; SUMAGIN, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, Chicago, p. 1-13, mar. 2020.
- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, Southampton, v. 2, n. 3, p. 355–374, mar. 2010
- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, Southampton, v. 45, n. 5, p. 1105–1115, out. 2017.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: revisão. *Acta Cir Bras.*, v. 17, n. 6, p.417-421, 2002.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, Bangkok, v. 23, n.1, p. 37–45, ago. 2014.
- CHYLIKOVA, J.; DVORACKOVAB, J.; TAUBER, Z.; KAMARADC, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, Ostrava*, v. 162, n. 2, p. 79-82, jun. 2018.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, v. 162, n. 1, p. 156-9, abr. 1987

CILDIR, G.; AKINCILAR, S. C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. *Trends in Molecular Medicine*, Singapore, v. 19, n. 8, p. 487–500, jun. 2013.

COCKBAIN, A. J.; TOOGOOD, G. J.; HULL, M. A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut*, Leeds, v. 61, p. 135–149, abr. 2011.

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Plos One*, Sheffield, v. 5, n. 1, jan. 2010.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, Madri, v. 71 n. 2, p. 332–338, maio. 2012.

DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, Houston, v. 11, n. 1, p. 421–449, set. 2016.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Minas Gerais, v. 39, n. 4, p. 343–350, mai. 2003.

FATIMA, S. et al. High-fat diet feeding and palmitic acid increase CRC growth in β 2AR-dependent manner. *Cell Death and Disease*, Hong Kong, v. 10, n. 711, set 2019.

FATIMA, S. et al. Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development. *Cell. Mol. Life Sci.*, Hong Kong, v. 76, p. 2547-2557, abr 2019.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

GRAÇA, A. C. S.; CORRÊA, J. W. N. Macrófagos de fenótipo M1 e M2 associados à disfunção endotelial. *Scientia Amazonia*, Manaus, v. 7, n. 2, p. 21-33, 2018.

GRIESS, P. *Ber. Deutsch Chem. Ges.* 12: 426–8, 1879.

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, Suita, v. 56, n. 4, p. 901–911, abr. 2007.

HOSSAIN, Z.; HOSOKAWA, M.; TAKAHASHI, K. Growth Inhibition and Induction of Apoptosis of Colon Cancer Cell Lines by Applying Marine Phospholipid. *Nutrition and Cancer*, Kyoto, v. 61, n. 1, p. 123–130, dez. 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, Boston, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, Boston, v. 95, n. 5, p. 2409–2415, maio. 1995.

Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas de Câncer. Instituto Nacional de Câncer, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: março de 2020.

ISIDRO, R. A.; APPLEYARD, C. B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Ponce v. 311, n. 1, p. 59–73, jul. 2016.

IYENGAR, N. M.; GUCALP, A.; DANNENBERG, A. J.; HUDIS, C. A. Obesity and cancer mechanisms: Tumor microenvironment and inflammation. *Journal of Clinical Oncology*, New York, v. 34, n. 35, p. 4270–4276, dez. 2016.

IZAOLA, O.; DE LUIS, D.; SAJOUX, I.; DOMINGO, J. C.; VIDAL, M. Inflamación y obesidade (lipoinflamación). *Nutr Hosp.*, Valladolid, v. 31, n. 6, p. 2352-2358, jun. 2015.

KOLB, R.; SUTTERWALA, F. S.; ZHANG, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol.*, Iowa, v. 29, p. 77–89, 2016.

KORBECKI, J.; BAJDAK-RUSINEK, K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflammation Research*, Katowice, v. 68, n. 11, p. 915-932, nov. 2019.

KWAN, H. Y. et al. The anticancer effect of oridonin is mediated by fatty acid synthase suppression in human colorectal cancer cells. *J Gastroenterol*, Hong Kong, v. 48, n. 2, p. 182-192, jun 2012.

LEE, M. T.; WARREN, M. K. CSF-1 induced resistance to viral infection in murine macrophages. *J Immunol.*, v. 138, n. 9, p. 3019-22, maio. 1987.

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

LUND, M. E; TO, J.; O'BRIEN, B. A.; DONNELLY, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, New South Wales, v. 430, p. 64–70, jan. 2016.

MAEß, M. B.; WITTIG, B.; CIGNARELLA, A.; LORKOWSKI, S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *Journal of Immunological Methods*, Jena, v. 402, n. 1–2, p. 76–81, jan. 2014.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Comunicado técnico Embrapa, Colombo, n. 427. 2018. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104215/1/CT4271572final2.pdf>>. Acesso em 03 dez. 2021.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature*, Milan, v. 454, n. 7203, p. 436–444, jul, 2018.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, Maringá, v. 19, n. 6, p. 761–770, dez. 2006.

MASOODI, M.; KUDA, O.; ROSSMEISL, M.; FLACHS, P.; KOPECKY, J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA, Lausanne)* v. 1851, n. 4, p. 503–518, abr. 2015.

Ministério da Saúde. Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>. Acesso em mar. 2020.

MOGHADDAM, S. A. et al. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, Mashhad, (), -, jan 2018.

MORAES-VIEIRA, P. M. et al. RBP4 Activates Antigen-Presenting Cells, Leading to Adipose Tissue Inflammation and Systemic Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, Boston, v. 19, n. 3, p. 512–526, mar. 2014.

MORAN, A.; PRENDERGAST, M.; APPELMELK, B. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 105–115, jun. 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 5 ed. New York: Freeman, 2008, p. 343–370.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, v. 267, n. 17, p. 5421–6, Set. 2000.

ORTHMAN, R. A. Dietary Lipids and Cancer. *Libyan J Med*, Winnipeg, v. 2, n. 4, p. 180–184, dez 2007.

PAKIET, A.; KOBIELA, J.; STEPNOWSKI, P.; SLEDZINSKI, T.; MIKA, A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids in Health and Disease*, Gdansk, v. 18, n. 1, p. 29, jan. 2019.

PARK, E. K.; JUNG, H. S.; YANG, H. I.; YOO, M. C.; KIM, C.; KIM, K. S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, Seoul, v. 56, n. 1, p. 45–50, jan. 2007.

POMPÉIA, C.; LOPES, L. R.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 33, n. 11, p. 1255–1268, nov. 2000.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas usando extrato de flores. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, jun. 2006.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients*, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 1–19, mar. 2018.

SALAÜN, H.; THARIAT, J.; VIGNOT, M.; MERROUCHE, Y.; VIGNOT, S. Obésité et cancer. *Bulletin Du Cancer*, Chartres-Le-Coudray, v. 104, n. 1, p. 30–41, jan. 2017.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*, Boston, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, mai. 2007.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.*, Rozzano, v.122, n. 3, p. 787-195, mar 2012.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. O que é a obesidade?. 2010. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/o-que-e-obesidade/>. Acesso em: mar. 2020.

SONG, M., GARRETT, W. S., CHAN, A. T. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*, Boston, v. 148, n. 6, p. 1244–1260, mai. 2015.

SOUZA, W. F. et al. Sinalização celular em câncer. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 30–33, 2014.

STARR, T; BAULER, T. J.; MALIK-KALE, P.; STEELE-MORTIMER, O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *Plos One*, Michigan, v. 13, n. 3, mar. 2018.

TEDESCO, S. et al. Convenience versus biological significance: Are PMA differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Frontiers in Pharmacology*, Itália, v. 9, p. 1–13, fev. 2018.

THAPA, B.; LEE, K. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Reports*, Chuncheon, v. 52, n. 6, p. 360-372, jun. 2019.

TVRZICKA, E.; KREMMYDA, L.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers*, Prague, v. 155. n. 2, p. 117-130, jun, 2013.

UYAR, G. O.; SANLIER, N. Association of Adipokines and Insulin, Which Have a Role in Obesity, with Colorectal Cancer. *Eurasian J Med*, Anakara, v. 51, n. 2, p. 191-195, 2019.

VENTURA, R. et al. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*, Menlo Park, v. 2, n. 8, p. 808-824, ago 2015.

VOLPATO, M.; HULL, M. A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer and Metastasis*, Leeds, v. 37, n. 2, p. 545-555, jul. 2018.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research*, Houston, v. 126, n. 11, p. 1549-1564, maio. 2020.

WU, K. et al. Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.*, Shanghai, v. 11, n. 1731, -, ago 2020.

YANG, Y. C. et al. Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF- κ B pathways. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Taichung, v. 24, n. 1, p. 204–212, jan. 2013.

YUM, H. W.; NA, H. K.; SURH, Y. J. Anti-inflammatory effects of docosahexaenoic acid: Implications for its cancer chemopreventive potential. *Seminars in CancerBiology*, Seoul, v. 40-41, p. 141–159, out 2016.

ZATTERALE, F. et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes, *Front. Physiol.*, Naples, v. 10, n. 1607, jan 2020.

ZHOU, H.; URSO, C. J.; JADEJA, V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. *Journal of Inflammation Research*, SOUTH ORANGE, v. 13, p. 1-14, jan. 2020.

ZHU, L.; ZHAO, Q.; YANG, T.; DING, W.; ZHAO, Y. Cellular Metabolism and Macrophage Functional Polarization. *IntRevofImmunol*, Beijing, v. 34, n. 1, p. 82–100, jan. 2015.