

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Interferência do TSPO sobre as vias de ativação de adipócitos da linhagem 3T3-L1

Éric Diego Barioni

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Profa. Tit. Dra. Sandra H. P. Farsky

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Interferência do TSPO sobre as vias de ativação de adipócitos da linhagem 3T3-L1

Éric Diego Barioni

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Profa. Tit. Dra. Sandra H. P. Farsky

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B2521 Barioni, Eric Diego
Interferência do TSPQ sobre as vias de ativação
de adipócitos da linhagem 3T3-L1 / Eric Diego
Barioni. - São Paulo, 2018.
117 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Farsky, Sandra Helena Polisselli

1. Imunotoxicologia. 2. Células adiposas. 3.
Inflamação. 4. Obesidade. 5. Diazepam. I. T. II.
Farsky, Sandra Helena Polisselli, orientador.

Éric Diego Barioni

Interferência do TSPO sobre as vias de ativação de adipócitos da linhagem 3T3-L1

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Maurício Yonamine
Presidente

Prof. Dr. Fábio Bessa Lima
1º Examinador

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
2º Examinador

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
3º Examinador

Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron
4º Examinador

São Paulo, 02 de fevereiro de 2018

Aos meus pais

Maria Elenice Gomes Barioni

e

Agnaldo Ribeiro Barioni

Obrigado por acreditar em mim, obrigado por me apoiar

Obrigado pelos conselhos, obrigado pelos dias e obrigado pelas noites

Amo vocês!!!

A minha avó

Izaura Ribeiro Barioni

Linda e adorável, gostaria que você fosse eterna

Obrigado por acreditar e investir tanto amor em mim!

Amo você!!!

A minha noiva

Mayara Crislaine da Cruz Carvalho

Nós sabemos o quanto não foi fácil, mas você sempre esteve comigo

Você é a minha melhor conquista, obrigado por tudo

Amo você!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, a razão de toda existência. Seu brilho intenso ilumina meu caminho, me apoia, e me faz forte e crente.

Agradeço a FAPESP (2013/11027-7) pelo financiamento que foi essencial para o meu desenvolvimento e para o desenvolvimento do nosso projeto.

Agradeço minha orientadora Sandra Farsky por todo o conhecimento que compartilhou e por me incentivar a sempre empurrar meus limites. Com certeza fui longe graças a você! Não vivemos momentos fáceis, mas isso não diminui o respeito e admiração que tenho por você!

Agradeço aos meus familiares e amigos, em especial a Maria Aparecida da Cruz Carvalho e ao Pedro Antônio Gomes Carvalho, obrigado pelos domingos que passamos juntos, pela preocupação, e por me considerar muito mais que um genro, por me considerar um filho.

Agradeço aos colaboradores da USP, em especial aos Professores do bloco 13B e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP/SP). Todos foram importantes, foram exemplos. Em especial gostaria de agradecer a Profa. Regina Lúcia de Moraes Moreau.

Agradeço aos colaboradores da USP, em especial aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP/SP). Todos foram importantes, foram exemplos, mas você Cláudia, você eu vou levar sempre comigo.

Agradeço aos colegas do laboratório. Aprendi muito com todos vocês e carrego um pedacinho de cada um comigo. No laboratório, nossa amizade foi como uma construção, a cada dia um novo tijolinho, o respeito, a lealdade, espero que possamos nos reencontrar sempre!

Agradeço o amigo Rodrigo de Azevedo Loiola e Rafael Menck. Grandes parceiros.

Agradeço a Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox), na pessoa dos professores Dr. Daniel Junqueira Dorta, Dra. Danielle Palma de Oliveira e Dr. Maurício Yonamine.

Agradeço o Conselho Regional de Biomedicina da 1ª Região (CRBM-1), na pessoa dos doutores: Lobbe Neto, Marcelo Abissamra Issas, Edgar Garcez Junior, Dácio Leandro Campos, Marcos Caparbo, Wilson de Almeida Siqueira e Michel Sant'ana Del Pinho.

Agradeço a professora Adriana Lino dos Santos Franco. À confiança que sempre depositou em meu trabalho o meu muito obrigado!

A todos que me ajudaram e, foram muitos... O meu obrigado de coração!!!

*“...cavar masmorras ao vício e
construir templos à virtude. Esta é a missão
dos que morreram e viveram para a luz...”*

MM.:II.:C.:T.:M.:R.:

RESUMO

BARIONI, E. D. **Interferência do TSPO sobre as vias de ativação de adipócitos da linhagem 3T3-L1**. 2018. 117f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A obesidade está associada a um processo inflamatório crônico de baixa intensidade e representa um dos fatores de risco para o desenvolvimento de uma série de comorbidades. A proteína TSPO está envolvida em inúmeras funções celulares, incluindo biossíntese e transporte de esteróides, transporte de porfirinas, apoptose, biossíntese do heme, processos oxidativos e imunomodulação. Ademais, a presença e a função da proteína TSPO no tecido adiposo e na inflamação ainda não estão bem estabelecidas. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi validar a expressão e função do TSPO durante a diferenciação de células 3T3-L1, e investigar se o tratamento de adipócitos 3T3-L1 com diazepam, um benzodiazepínico de ação central (GABA_A) e periférica (TSPO), é capaz de modular os efeitos inflamatórios induzidos pela incubação das células 3T3-L1 com TNF- α . Nossos resultados evidenciaram que, em nosso estudo, o tratamento de pré-adipócitos com diazepam não modulou a adipogênese. Entretanto, apesar de o diazepam *per se* não modular o acúmulo de triacilglicerol e a expressão gênica e protéica de PPAR- γ ; em células estimuladas pelo TNF- α , o tratamento com diazepam foi capaz de reverter a diminuição da expressão gênica e protéica de PPAR- γ induzida pelo TNF- α . Ademais, o tratamento dos adipócitos com diazepam foi capaz de modular positivamente a expressão protéica de TSPO, efeito este que não observamos em células tratadas pelo clonazepam, um benzodiazepínico de ação exclusivamente central. Em resumo, os dados obtidos neste estudo, pela primeira vez, demonstram a possível relação entre as vias que controlam a sinalização de TSPO, TNF- α e PPAR- γ . Assim, nos é possível inferir que a ativação de TSPO pelo seu ligante diazepam foi capaz de modular a ativação de NF- κ B induzida pelo TNF- α , promovendo, com a diminuição da lipólise e aumento da expressão gênica de TSPO e gênica e protéica de PPAR- γ , o reestabelecimento da homeostase celular, o que aumentaria a sobrevivência das células, a atividade mitocondrial, e a atividade adipogênica dos adipócitos.

Palavras-chave: Imunotoxicologia, Células Adiposas, Inflamação, Obesidade, Diazepam.

ABSTRACT

BARIONI, E. D. **Interference of TSPO upon the activation pathways of 3T3-L1 adipocytes**. 2018. 117f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Obesity is associated with a chronic low-grade inflammation and these represents one of the risk factors to development of other non-communicable diseases. TSPO 18 kDa is involved in several cellular functions, including biosynthesis and steroids transport, porphyrin transport, apoptosis, heme biosynthesis, oxidative metabolism and immunomodulation. Furthermore, the TSPO expression and function on adipose tissue and in the chronic low-grade inflammation have not been established. Thus, the aim of present study was to validate the TSPO expression and function on the 3T3-L1 differentiation process and to investigate whether diazepam treatment is able to modulate the TNF- α induced inflammatory effects on 3T3-L1 cells. Our results showed that diazepam treatment of preadipocytes was not able to modulate the adipogenesis. However, although diazepam treatment *per se* does not modulate the triacylglycerol accumulation and gene and protein expression of PPAR- γ ; in TNF- α stimulated adipocytes, the treatment with diazepam was able to modulate the decreased of PPAR- γ gene and protein expression induced by TNF- α . In addition, the diazepam treatment of adipocytes was able to positively modulate the TSPO protein expression, an effect that we did not observe in cells treated with clonazepam, a central benzodiazepine ligand. In summary, the data obtained in this study, for the first time, demonstrate the possible relationship between the pathways that control the TSPO, TNF- α and PPAR- γ signaling. Thus, it is possible that the activation of TSPO by diazepam was able to modulate TNF- α -induced activation of NF- κ B, promoting the reduction of lipolysis and increased of TSPO gene expression and PPAR- γ gene and protein expression, reestablishment of cellular homeostasis, which would increase cell survival, mitochondrial activity, and adipogenic activity of adipocytes.

Key-words: Immunotoxicology, Adipose Cells, Inflammation, Obesity, Diazepam.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Subunidades protéicas do complexo heteromérico do receptor TSPO ...	27
Figura 2 – Protocolos de diferenciação das células 3T3-L1	34
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose.....	37
Figura 4 – Diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros	44
Figura 5 – Eficiência de amplificação dos genes TSPO e 18S	46
Figura 6 – Expressão gênica quantitativa de TSPO em células 3T3-L1 e Raw 264.7	46
Figura 7 – Quantificação da viabilidade celular por citometria de fluxo.....	47
Figura 8 – Avaliação da taxa de proliferação de pré-adipócitos.....	48
Figura 9 – Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	49
Figura 10 – Quantificação de nitritos pelo método de <i>Griess</i>	50
Figura 11 – Quantificação dos níveis de IL-6 e MCP-1	51
Figura 12 – Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	52
Figura 13 – Quantificação de nitritos pelo método de <i>Griess</i>	53
Figura 14 – Expressão protéica de TSPO em macrófagos primários	54
Figura 15 – Expressão protéica de F4/80, MHC de classe II e CD 23	55
Figura 16 – Quantificação da fagocitose com Zimosan A.....	56
Figura 17 – Produção de NO por macrófagos primários.....	58
Figura 18 – Determinação da viabilidade celular por MTT	59
Figura 19 – Determinação do triacilglicerol intracelular	60
Figura 20 – Determinação do triacilglicerol intracelular	61
Figura 21 – Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ	62
Figura 22 – Expressão protéica de TSPO por <i>Western blotting</i>	64
Figura 23 – Viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1 por citometria de fluxo	65
Figura 24 – Produção de NO e IL-6 por pré-adipócitos 3T3-L1	67
Figura 25 – Expressão gênica de TSPO durante a diferenciação celular.	68
Figura 26 – Expressão protéica de TSPO e PPAR- γ durante a diferenciação celular	69
Figura 27 – Acúmulo intracelular de triacilglicerol.....	71
Figura 28 – Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos maduros.	72

Figura 29 – Expressão protéica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos 3T3-L1 maduros.	74
Figura 30 – Atividade enzimática mitocondrial de adipócitos 3T3-L1 maduros.....	76
Figura 31 – Acúmulo intracelular de triacilglicerol e glicerol livre	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	39
Tabela 2 – Valor de <i>slope</i> do gene TSPO para validação experimental.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

TA – Tecido adiposo

ATM – Macrófagos do tecido adiposo

TAM – Tecido adiposo marrom

TAB – Tecido adiposo branco

UCP-1 – Proteína desacopladora - 1

ATP – Trifosfato de adenosina

PPAR- γ – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

IL-6 – Interleucina 6

LPS – Lipopolissacarídeo

TLR-4 – Receptor tipo *toll* 4

TLR-2 – Receptor tipo *toll* 2

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio

PCR – Proteína C reativa

PCR – Reação em cadeia da polimerase

IL-1 – Interleucina 1

IL-8 – Interleucina 8

IL-18 – Interleucina 18

TNFR I – Receptor do tipo I para TNF- α

TNFR II – Receptor do tipo II para TNF- α

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

GLUT-4 – Proteína transportadora de glicose 4

IRS-1 – Substrato do receptor de insulina 1

IBMX – Isobutilmetilxantina

DEX – Dexametasona

C/EBP- α - CCAAT/*enhancer binding protein alpha*

BZD – Benzodiazepínicos

CBR – Receptores centrais para benzodiazepínicos
SNC – Sistema nervoso central
PBR – Receptores periféricos para benzodiazepínicos
TSPO – 18-kDa *translocator protein*
IBP - 18-kDa *isoquinoline-binding protein*
VDAC - 34-kDa *voltage-dependent anion channel protein*
ANC - 30-kDa *adenine nucleotide carrier*
DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's*
CS - *Calf serum*
SFB - Soro fetal bovino
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP – Universidade de São Paulo
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
MDI – Meio de diferenciação de adipócitos
DMSO – Dimetilsulfóxido
PBS - *phosphate buffered solution*
NO – Óxido nítrico
cDNA – DNA complementar
DCFH - *dichlorofluorescein diacetate*
DCF - *2'-7'-dichlorofluorescein*
DAPI - *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride*
HBSS - Solução balanceada de *Hank's*
ERO – Espécies reativas de oxigênio
PI – Iodeto de propídeo
mRNA – RNA mensageiro
DMF – Dimetilformamida
iNOS – Inducible nitric oxide synthases
mitoK_{ATP} - Canais mitocondriais de K⁺ sensíveis a ATP
PKCε1 - Proteína quinase C *epsilon 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Aspectos gerais do tecido adiposo	21
1.2. Translocator protein (18kDa) TSPO	25
2. OBJETIVO	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Células imortalizadas e condições de cultura	31
3.2. Animais	31
3.3. Obtenção de macrófagos para os ensaios in vitro	31
3.4. Ensaio para diferenciação das células 3T3-L1	32
3.5. Estímulos inflamatórios	32
3.6. Protocolos de tratamento	33
3.7. Avaliação da proliferação da linhagem 3T3-L1	34
3.8. Quantificação da viabilidade celular de pré-adipócitos por citometria de fluxo	35
3.9. Quantificação da concentração de nitritos pela reação de Griess	35
3.10. Avaliação da atividade mitocondrial de adipócitos 3T3-L1 por MTT	36
3.11. Expressão gênica de TSPO e/ou PPAR- γ na diferenciação e em adipócitos maduros da linhagem 3T3-L1	36
3.11.1. <i>Extração de RNA total</i>	36
3.11.2. <i>Qualidade dos RNAs</i>	37
3.11.3. <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Times – PCR)</i>	37
3.11.3.1. <i>Preparação dos cDNAs</i>	37
3.11.4. <i>qPCR para quantificação da expressão relativa</i>	38
3.12. Quantificação da expressão protéica de TSPO e PPAR- γ por Western blotting	39
3.13. Determinação do acúmulo de triacilglicerol em adipócitos 3T3-L1	40
3.14. Citometria de fluxo: quantificação da expressão protéica de TSPO, F4/80, MHC de classe II e CD 23 em macrófagos primários	41
3.15. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio em células Raw 264.7 e 3T3-L1	41
3.16. Ensaio de fagocitose com Zimosan A	42
3.17. Quantificação do glicerol livre	43

3.18. Quantificação de mediadores inflamatórios	43
3.19. Análise estatística	43
4. RESULTADOS	44
4.1. SEÇÃO 01: ensaio para diferenciação de células 3T3-L1	44
4.2. SEÇÃO 02: expressão gênica de TSPO em células 3T3-L1 e Raw 264.7: ensaios de RT-PCR em tempo real	45
4.3. SEÇÃO 03: ensaios com pré-adipócitos 3T3-L1 tratados com diazepam (1, 10, 100 ou 1000 nM) ou LPS (10, 100 ou 1000 ng/mL)	46
4.3.1. <i>Ensaio para quantificação da viabilidade celular de pré-adipócitos</i> .	47
4.3.2. <i>Ensaio para avaliação da taxa de proliferação de pré-adipócitos</i>	47
4.3.3. <i>Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de pré-adipócitos</i>	48
4.3.4. <i>Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de pré-adipócitos</i>	49
4.3.4. <i>Quantificação de mediadores inflamatórios</i>	50
4.4. SEÇÃO 04: ensaios com células da linhagem Raw 264.7 e macrófagos primários	51
4.4.1. <i>Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de células da linhagem Raw 264.7</i>	51
4.4.2. <i>Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de células da linhagem Raw 264.7 e de macrófagos primários</i>	52
4.4.3. <i>Expressão protéica de TSPO em macrófagos primários</i>	53
4.4.4. <i>Expressão protéica de F4/80, MHC de classe II e CD23 em macrófagos primários</i>	55
4.4.5. <i>Ensaio para quantificação da fagocitose com Zimosan A</i>	56
4.4.6. <i>Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de macrófagos primários tratados simultaneamente com diazepam e LPS</i>	57
4.5. SEÇÃO 05: efeitos dos tratamentos com ligantes de TSPO ou LPS sobre a diferenciação de células 3T3-L1	58
4.5.1. <i>Viabilidade por MTT</i>	58
4.5.2. <i>Acúmulo de triacilglicerol</i>	59
4.5.3. <i>Expressão gênica de TSPO e PPAR-γ</i>	62
4.5.4. <i>Expressão protéica de TSPO</i>	63
4.6. SEÇÃO 06: novo protocolo e concentrações de diazepam para o tratamento de pré-adipócitos e adipócitos da linhagem 3T3-L1	64
4.6.1. <i>Ensaio para quantificação da viabilidade celular em pré-adipócitos</i> 64	
4.6.2. <i>Ensaio para quantificação de nitritos e IL-6 nos sobrenadantes de pré-adipócitos 3T3-L1 estimulados pelo TNF-α</i>	66

4.7. SEÇÃO 07: efeitos dos tratamentos com diazepam e/ou TNF-α sobre o processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros	67
4.7.1. Expressão gênica de TSPO durante a diferenciação celular: ensaio de RT-PCR em tempo real	67
4.7.2. Expressão protéica de TSPO e PPAR-γ durante a diferenciação celular: ensaio de Western blotting	68
4.7.3. Quantificação do acúmulo de triacilglicerol	71
4.8. SEÇÃO 08: efeitos dos tratamentos com diazepam e/ou TNF-α em adipócitos maduros	72
4.8.1 Expressão gênica de TSPO e PPAR-γ em adipócitos maduros: ensaio de RT-PCR em tempo real	72
4.8.2 Expressão protéica de TSPO e PPAR-γ em adipócitos maduros: ensaio de Western blotting	73
4.8.3. Quantificação da atividade mitocondrial de adipócitos maduros por MTT	75
4.8.4. Quantificação do acúmulo de triacilglicerol e do glicerol livre	76
5. DISCUSSÃO	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	102
ANEXO 2 – CURRÍCULO DA PLATAFORMA LATTES	103
ANEXO 3 – FICHA DO ALUNO ATUALIZADA	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) compreende um tipo especial de tecido conjuntivo formado predominantemente por adipócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006), e sustentado por uma matriz de tecido conjuntivo contendo fibras de colágeno e reticulares, fibras nervosas, estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes, fibroblastos e pré-adipócitos (AHIMA & FLIER, 2000). As células adiposas, diferentemente de outras células espalhadas pelo corpo, possuem a maquinaria enzimática necessária para sintetizar (lipogênese) ou mobilizar (lipólise) triglicerídeos, sendo estas células perfeitamente adaptadas para armazenar gordura, sem que isso comprometa sua integridade funcional (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Deste modo, o TA é um dos principais reservatórios de energia corporal, e também responsável por modelar o fenótipo corporal de homens e mulheres, bem como fornecer proteção mecânica contra impactos, preencher espaços e posicionar determinados órgãos e/ou vísceras ocultas em seus lugares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006).

A histogênese do TA é um processo altamente coordenado, e tem seu início antes do nascimento. O adipócito maduro é o resultado final do comprometimento de células tronco mesenquimais indiferenciadas que, além de formar outros tipos celulares, dão origem a fibroblastos e lipoblastos. Os lipoblastos ou pré-adipócitos, são células morfológicamente semelhantes a fibroblastos, porém logo acumulam gordura em seu citoplasma e diferenciam-se em células adiposas maduras. Este processo, no entanto, é altamente controlado e dependente da ativação de fatores de transcrição adipogênicos, tais como PPAR- γ e C/EBP- α , β e δ (CCAAT/*enhancer binding protein*; FARMER, 2004). Assim, tem sido mostrado que a expressão de PPAR- γ e C/EBP- α são altamente dependentes um do outro, e regulam positivamente a adipogênese, enquanto que a expressão de C/EBP- β e δ potencializam as expressões de PPAR- γ e C/EBP- α (FARMER, 2004). Adicionalmente, sinais hormonais e fatores nutricionais podem afetar positiva ou negativamente a diferenciação dos adipócitos, assim como também componentes envolvidos na interação célula-célula e célula-matriz (GREGOIRE et al., 1998).

Nos mamíferos, o TA pode ser encontrado sob duas diferentes formas, denominadas: tecido adiposo unilocular ou branco e tecido adiposo multilocular ou marrom (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006; FONSECA-ALANIZ et al., 2007). O tecido adiposo marrom (TAM) possui distribuição corporal limitada, um citoplasma contendo inúmeras gotículas lipídicas e um grande número de mitocôndrias que liberam calor pela oxidação de ácidos graxos, processo este denominado termogênese e dependente da atividade da proteína desacopladora-1 (UCP-1). A UCP-1 está localizada na membrana mitocondrial interna e é responsável por impedir a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), desviando o acúmulo de prótons, gerados no espaço intermembranoso mitocondrial durante o ciclo de Krebs, do complexo F_1F_0 (ATP sintase), e permitindo que o potencial gerado se dissipe como calor (CANNON & NEDERGAARD, 2004; BOUDINA & GRAHAM, 2014). Por este motivo, o TAM está praticamente ausente em humanos adultos, mas é encontrado em fetos, recém-nascidos, pequenos mamíferos, e em animais que hibernam (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006).

Diferentemente, os adipócitos maduros do tecido adiposo branco (TAB), armazenam triglicerídeos em uma única grande gota lipídica, possuem um número relativamente menor de pequenas mitocôndrias, e sua participação na termogênese é praticamente desprezível (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006; FONSECA-ALANIZ et al., 2007; BOUDINA & GRAHAM, 2014). O TAB, ao contrário do TAM, está amplamente distribuído pelo organismo, e suas principais ações podem ser divididas em: lipogênicas (biossíntese, incorporação e armazenamento de triacilglicerol) e lipolíticas (liberação de ácidos graxos livres e glicerol). Ademais, o TAB, além de fornecer energia quando necessário, é um excelente isolante térmico, e dado a sua distribuição abrangente, tal como na derme e tecido subcutâneo, possui papel relevante na preservação da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Com o passar dos anos e desenvolvimento de novos estudos, observou-se a importância endócrina, bem como parácrina e/ou autócrina, do TAB, visto sua capacidade de produzir e/ou secretar substâncias coletivamente chamadas de adipocinas, e que consolidaram a ideia do TAB como um órgão dinâmico e central na regulação do metabolismo (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Assim, o TAB, além de modular o funcionamento de muitos tecidos corporais pela liberação de adipocinas, sofre a influência de muitos hormônios, fatores de crescimento, e outras substâncias

endógenas e/ou exógenas, uma vez que os adipócitos possuem uma ampla variedade de receptores distribuídos pelo citosol e membrana plasmática.

A linhagem de células 3T3-L1 é amplamente empregada em estudos que visem avaliar a função de células adiposas *in vitro* e compreende uma linhagem de pré-adipócitos murino que se diferencia em adipócitos maduros após sua confluência e pela exposição adicional destas células a um coquetel adipogênico contendo: a) isobutilmetilxantina (IBMX), b) dexametasona (DEX) e, c) insulina. Ademais, a exposição das células 3T3-L1 ao coquetel adipogênico induz uma cascata de eventos celulares que culminam com a ativação de fatores de transcrição, tais como C/EBP- β e δ , que induzem a expressão de outros fatores essenciais para a completa diferenciação destas células, tais como o PPAR- γ e o C/EBP- α (FARMER, 2004).

Dentre as mais variadas adipocinas que podem ser produzidas pelos adipócitos do TAB, são encontradas desde citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6; FONSECA-ALANIZ et al., 2007), que sabidamente são secretadas em resposta a agentes endógenos e/ou exógenos, tais como o lipolissacarídeo de *E. coli* (LPS) a partir da ativação de receptores reconhecidamente encontrados em células adiposas denominados de TLR-4 (*toll-like receptor-4*; POULAIN & GODEFROY, 2007); a fatores de crescimento, representados principalmente pelo fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Além disso, os adipócitos podem produzir e secretar proteínas da via alternativa do complemento (adipsina), substâncias capazes de controlar a pressão arterial (angiotensinogênio), a coagulação sanguínea (inibidor do ativador de plasminogênio-1, PAI-1), e substâncias que, entre outras coisas, modulam a homeostase glicêmica (adiponectina, resistina, visfatina, leptina; FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Deste modo, fica evidente que doenças que afetem a homeostase do tecido adiposo pela sua escassez (lipodistrofias ou lipoatrofias) ou excesso (obesidade) podem impactar negativamente o funcionamento de muitos tecidos e favorecer o desenvolvimento de outras doenças.

A obesidade é uma doença crônica do tecido adiposo, caracterizada pelo anormal e/ou excessivo acúmulo de gordura corporal, e está associada a uma inflamação crônica de baixa intensidade, determinada pela ativação pró-inflamatória de pré-adipócitos e adipócitos, pelo aumento abundante no número de macrófagos ativados no tecido adiposo, e pelo aumento nos níveis plasmáticos de proteína C

reativa (PCR), interleucina 1 (IL-1), IL-6, interleucina 8 (IL-8), interleucina 18 (IL-18), leptina e TNF- α (KAHN et al., 2006; KIM et al., 2006; YE; MCGUINNESS, 2013). Estas citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, além de afetar a função metabólica de vários órgãos, incluindo fígado, coração, músculos e cérebro (HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006), prejudicam a sinalização da insulina, desencadeando algumas das alterações crônicas decorrentes da obesidade, como a resistência à insulina e o subsequente desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 2 (ZEYDA; STULNIG, 2007; YE; MCGUINNESS, 2013).

O TNF- α é uma das principais adipocinas envolvidas na inflamação crônica de baixa intensidade evidenciada na obesidade. Esta citocina é produzida por adipócitos e pelas células do microambiente, tais como macrófagos; interage com as células de maneira endócrina, parácrina e/ou autócrina, por meio de receptores para TNF- α do tipo I (TNFR1) ou II (TNFR2), ambos, expressos no tecido adiposo (HUBE; LEE, 1999), e atua via ativação do fator de transcrição NF- κ B (SERRANO-MARCO et al., 2012). Assim, a ativação de NF- κ B via TNF- α contribui para a síntese e secreção de outras adipocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 (SERRANO-MARCO et al., 2012). Este microambiente inflamado compromete a homeostase das células, e interfere diretamente na expressão de genes adipogênicos, tais como PPAR- γ , C/EBP- α e C/EBP- δ , essenciais para o desenvolvimento fenotípico e funcionamento adequado das células adiposas (KUDO et al., 2004). Em adipócitos maduros, além de induzir lipólise (JIN et al., 2014), o TNF- α compromete as vias de sinalização da insulina, por interferir, não somente, mas também, com o funcionamento do receptor de insulina via inibição de sua atividade tirosina quinase (HOTAMISLIGIL et al., 1996; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

1.2. Translocator protein (18kDa) TSPO

Os benzodiazepínicos (BZD) estão entre os medicamentos psicotrópicos¹ mais prescritos e utilizados no mundo devido a sua grande eficácia, baixa toxicidade e aos seus efeitos como ansiolítico, sedativo, anticonvulsivante e relaxante muscular (SILVA et al., 2003; RUIZ et al., 1993; CARLINI et al., 2001). Introduzidos na terapêutica no início da década de 60, estes medicamentos alavancaram o tratamento de distúrbios psíquicos como a tensão, o medo e a ansiedade (WOODS et al., 1992; KINANI et al., 2007; RISS et al., 2008). No Brasil, aproximadamente 100 medicamentos à base de benzodiazepínicos, possuem, na maioria das vezes, nomes químicos que terminam com o sufixo pam (diazepam, lorazepam etc.). Estes medicamentos classificados como psicotrópicos, possuem grande propriedade reforçadora e, desta forma, são passíveis de auto-administração, o que significa que podem levar à dependência (CARLINI et al., 2001). Os principais efeitos clínicos dos BZD estão diretamente ligados à sua alta afinidade por receptores centrais para benzodiazepínicos (CBR) acoplados a receptores GABA_A presentes no Sistema Nervoso Central (SNC). Entretanto, outros receptores, em órgãos periféricos, têm sido identificados (PBR, *peripheral benzodiazepine receptor*) nos rins, fígado, pulmões, tecidos endócrinos produtores de esteróides, como a glândula adrenal e testículos, e células envolvidas com o sistema imune, tais como as células polimorfonucleares e mononucleares (SILVA, 2003; BRAESTRUP; SQUIRES, 1977; PAPADOPOULOS, 1993; 2006; ZAVALA et al., 1984; MARINO et al., 2001; SAANO, 1988; OKE, et al., 1992; GARNIER et al., 1993). Estes receptores atualmente chamados de *translocator protein* 18 kDa (TSPO) têm sido fonte de inúmeros estudos que visam esclarecer, não apenas sua relação com algumas doenças, mas o seu papel farmacológico e fisiológico na biossíntese e transporte de esteróides, no transporte de porfirinas, na apoptose, na biossíntese do heme, no transporte de íons, na respiração celular, nos processos oxidativos e na imunomodulação (CASELLAS et al., 2002; PAPADOPOULOS et al., 2006; ZAVALA, 1997; TAKETANI et al., 1995; BASILE et al.,

¹ Medicamentos psicotrópicos são aqueles que “agem no Sistema Nervoso Central produzindo alterações de comportamento, humor e cognição, possuindo grande propriedade reforçadora sendo, portanto, passíveis de auto-administração”

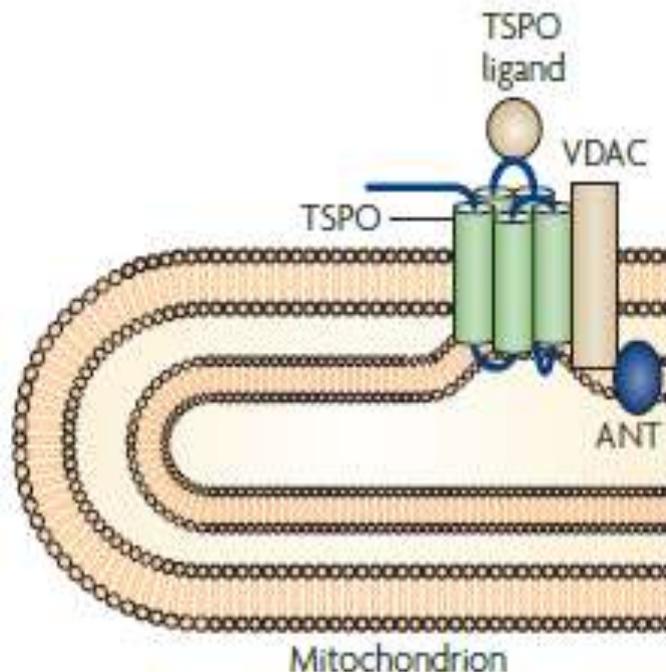
1988; HIRSH et al., 1998; BESMAN et al., 1989; PAPADOPOULOS, 2014; TU et al., 2014).

O receptor TSPO, inicialmente conhecido como PBR, foi identificado em 1977, quando pesquisadores buscavam novos sítios de ligação em tecidos periféricos para medicamentos como o diazepam (BRAESTRUP; ALBRECHTSEN; SQUIRES, 1977; PAPADOPOULOS et al., 2006). Embora, principalmente por razões históricas, o termo PBR seja amplamente aceito pela comunidade científica, outras denominações têm sido encontradas na literatura, a saber: *mitochondrial benzodiazepine receptor*, *mitochondrial diazepam-binding inhibitor (DBI)*, *receptor complex*, *PK11195-binding sites*, *isoquinoline-binding protein (IBP)*, *benzodiazepine receptor peripheral*, *pk18* e *ω3 receptor*. Todos os termos supracitados, embora definam certas propriedades, não refletem a verdadeira função destes receptores e, por este motivo, Papadopoulos e colaboradores (2006), sugeriram três outras nomenclaturas à proteína, baseados, principalmente, em dados encontrados na literatura com relação a estrutura, função e localização celular.

Alguns dos fatores que influenciaram a modificação do termo PBR foram: 1) a imprecisão do termo “benzodiazepínico”, uma vez que nem todos os BZD, e ainda, outras estruturas, tais como o colesterol e a protoporfirina IX, são ligantes deste receptor; 2) a imprecisão do termo “receptor periférico”, uma vez que também é expresso em células da glia, localizadas no SNC, no Sistema Nervoso Periférico (SNP), e envolvidas com a produção de neuroesteróides e, 3) o fato de não atuar, única e exclusivamente, como receptor; sendo sua localização celular, na maioria das vezes, mitocondrial, e tendo como principais funções: - a ligação e o transporte de colesterol; - o transporte de proteínas e, - a ligação e o transporte de porfirinas (PAPADOPOULOS et al., 2006; MUKHERJEE; DAS, 2012). Sendo assim, o termo atualmente empregado TSPO (*translocator protein 18 kDa*), submetido e aprovado pelo HUGO *Gene Nomenclature Committee*, refere-se aos 18 kDa da subunidade protéica, independentemente de sua localização celular e, ainda, fornece segundo os autores, especificidade e flexibilidade à nomenclatura, uma vez que no mesmo estudo é sugerido a utilização de termos como mitoTSPO e nucTSPO para trabalhos que visem especificamente estudar a proteína TSPO localizada nas mitocôndrias e no núcleo das células, respectivamente (PAPADOPOULOS et al., 2006).

O receptor TSPO é produto de uma família de genes bacterianos evolutivamente conservados e expressos em diversos tecidos (LINDEMANN; FEUILLOLEY; PAPADOPOULOS, 2012). Apresenta-se na forma de um complexo heteromérico de três subunidades protéicas, sendo a primeira de 18 kDa (18-kDa *isoquinoline-binding protein*, IBP), a segunda de 34 kDa (34-kDa *voltage-dependent anion channel protein*, VDAC) e a terceira de 30 kDa (30-kDa *adenine nucleotide carrier*, ANT) (Figura 1). Possui cinco domínios transmembranas expressos principalmente em tecidos que sintetizam esteróides, como a glândula adrenal, o cérebro e os testículos e, conforme citado anteriormente, é também encontrado em órgãos como o coração, rins, fígado, pulmões, dentre outros (SCARF et al., 2011; MUKHERJEE; DAS, 2012; HARBERTS et al., 2013; PAPADOPOULOS et al., 2006).

Figura 1 – Subunidades protéicas do complexo heteromérico do receptor TSPO



Legenda: O receptor TSPO apresenta-se na forma de um complexo heteromérico formado por três subunidades protéicas, a saber: a primeira de 18-kDa (18-kDa *isoquinoline-binding protein*, IBP (TSPO)), a segunda de 34 kDa (34-kDa *voltage-dependent anion channel protein*, VDAC) e a terceira de 30 kDa (30-kDa *adenine nucleotide carrier*, ANT). Ademais, a proteína TSPO possui cinco domínios transmembranas expressos principalmente em tecidos que sintetizam esteróides, e está localizada majoritariamente no citosol entre as membranas mitocondriais externa e interna.

Fonte: Adaptado de Rupprecht e colaboradores, 2010.

No citosol, o receptor TSPO está localizado, predominantemente, na membrana externa e interna de mitocôndrias, regulando, principalmente, a respiração celular e a translocação do colesterol (PAPADOPOULOS et al., 2006; MUKHERJEE; DAS, 2012; ANHOLT et al., 1985; LINDEMANN; FEUILLOLEY; PAPADOPOULOS, 2012). No entanto, alguns estudos apontam a sua presença no complexo de Golgi, lisossomos, peroxissomos, no núcleo e na membrana plasmática de algumas células (O'BEIRNE et al., 1990; OKE et al., 1992; CANAT et al., 1992). Ademais, no SNC, a expressão de TSPO exhibe características farmacológicas que as distinguem de receptores centrais para benzodiazepínicos acoplados aos GABA_A (LINDEMANN; FEUILLOLEY; PAPADOPOULOS, 2012; ANHOLT et al., 1985).

O receptor TSPO e seus ligantes podem afetar inúmeras funções celulares dependendo do tipo celular em que está expresso e da densidade de expressão (GAVISH et al., 1992; IKEZAKI; BLACK, 1992; CANAT et al., 1993). Neste sentido, embora este receptor ofereça uma ampla variedade de sítios de ligação, a correta identificação e a real importância destes locais ainda é mal compreendida (SCARF et al., 2011). Dois ligantes seletivos e com afinidade em escala nanomolar têm sido fundamentais à caracterização de TSPO, a saber: o benzodiazepínico, com efeito agonista, Ro5-4864, e a isoquinolina carboxamida, com efeito antagonista, PK11195. No entanto, é importante ressaltar que sob algumas condições fisiológicas e dependendo da concentração utilizada, tipo de tecido, ambos podem apresentar efeitos similares (SCARF et al., 2011; SHANY et al., 1994; CHAUVEAU et al., 2008; RUPPRECHT et al., 2010).

A função fisiológica do TSPO *in vivo* ainda é mal compreendida, porém, segundo Papadopoulos e colaboradores (1997), esta proteína mostrou-se essencial para o desenvolvimento e sobrevivência de embriões geneticamente deficientes para TSPO (PAPADOPOULOS et al., 1997). Interessantemente, Tu e colaboradores (2014) recentemente mostraram que camundongos globalmente deficientes para TSPO se desenvolveram férteis e sem anormalidades. Esta nova evidência, além de contrariar o relato anterior, tem causado grande discussão no meio científico, e comprova a necessidade de mais estudos que visem esclarecer o papel e a importância fisiológica da proteína TSPO.

No tecido adiposo, a presença e função de TSPO ainda não está bem estabelecida. No entanto, Solveyra e colaboradores (1988) detectaram a expressão

de TSPO no tecido adiposo marrom interescapular de ratos; Lee e colaboradores (2004) mostraram a participação de TSPO e seus ligantes na diferenciação de células tronco mesenquimais de humanos em células do tecido adiposo e, Wade e colaboradores (2005) mostraram, pela primeira vez, a regulação positiva de fitas complementares de mRNA de TSPO 18-kDa durante o processo de diferenciação de células 3T3-L1.

Recentemente, Thompson e colaboradores (2013) sugeriram que o TSPO possui papel relevante na homeostasia do tecido adiposo, demonstrado pela redução da expressão gênica de TSPO no tecido adiposo branco de camundongos obesos, e pelas evidências que demonstraram que a administração *in vivo* de PK11195 modulou negativa e positivamente a expressão de genes envolvidos com a lipogênese e com a lipólise, respectivamente. Interessantemente, Gut e colaboradores (2013) mostraram que o tratamento de camundongos obesos com ligantes de TSPO, PK11195 e RO5-4864, além de reduzir o peso dos animais, aumentou a sensibilidade a glicose, enquanto Li e colaboradores (2014) e Campioli e colaboradores (2011) confirmaram novamente a expressão gênica de TSPO durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e SW872. Por último, Li e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento de células 3T3-L1 com ligantes de TSPO, tais como PK11195 e FGIN-1-27, modularam vias intracelulares ligadas a produção e liberação de adipocinas, bem como o metabolismo da glicose e a adipogênese.

Em conjunto, os dados apresentados acima, demonstram a expressão e a participação do TSPO no metabolismo das células adiposas, e sugerem a participação do TSPO nos processos de diferenciação de células 3T3-L1. No entanto, os dados que estão disponíveis na literatura não empregam *in vitro* o diazepam como um ligante para TSPO, e também não demonstram os possíveis efeitos do diazepam sobre as células adiposas da linhagem 3T3-L1 estimuladas pelo TNF- α .

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a expressão do TSPO durante a diferenciação de células 3T3-L1 (pré-adipócitos e adipócitos), e investigar se o tratamento de adipócitos 3T3-L1 com diazepam, um benzodiazepínico de ação central (GABA_A) e periférica (TSPO), é capaz de modular os efeitos causados pela incubação das células 3T3-L1 com TNF- α .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células imortalizadas e condições de cultura

Os pré-adipócitos 3T3-L1 (CL-173, ATCC®) foram adquiridos junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em nosso laboratório em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM; Gibco) contendo 4,5g/l de glicose, suplementado com 10% de CS (*calf serum*, Gibco).

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 (TIB 71, ATCC®) foram doados pela Profª Drª Regina P. Markus do Instituto de Biociências do Departamento de Fisiologia Geral da Universidade de São Paulo (IB-USP). As células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen).

3.2. Animais

Para a realização dos ensaios com macrófagos primários, camundongos Balb/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade e peso entre 20-25g, foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz e temperatura controlado, bem como acesso a alimento e água *ad libidum*. Os procedimentos experimentais foram realizados após indução de anestesia com cloridrato de ketamina (77mg/Kg) e cloridrato de xilazina (7mg/Kg) (Vetbrands) por via subcutânea. Vale ressaltar que o presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/498).

3.3. Obtenção de macrófagos para os ensaios *in vitro*

Para a realização dos ensaios *in vitro*, macrófagos primários foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, machos, adultos, 5 dias (120 horas)

após a injeção intraperitoneal de 3mL de tioglicolato de sódio a 4%. Para tanto, os animais foram anestesiados e exsanguinados por secção da artéria carótida e o lavado da cavidade peritoneal foi coletado após injeção intraperitoneal de 3mL de PBS estéril. O material coletado foi centrifugado (600g, 10min), ressuspendido em 1mL de PBS estéril, e o número total de macrófagos quantificado em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

3.4. Ensaio para diferenciação das células 3T3-L1

Os pré-adipócitos foram semeados em placas para cultivo celular contendo 24 poços. 48 horas após as células atingirem 100% de confluência, no dia 0 (T0), os pré-adipócitos foram estimulados com meio de diferenciação (MDI) composto por: 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 μ M de dexametasona (DEX) e 1,67 μ M de insulina (Sigma) em meio de cultura DMEM contendo 4,5 g/l de glicose e suplementado com 10% de SFB. Após 72 horas, no dia 3 (T3), o meio de diferenciação foi substituído por DMEM contendo 4,5 g/l de glicose suplementado com 10% de SFB e 1,67 μ M de insulina. Em seguida, no dia 5, o meio foi novamente substituído por DMEM contendo 4,5 g/l de glicose suplementado com 10% de SFB e 1,67 μ M de insulina, e este processo foi repetido a cada 48 ou 72 horas até o 10º dia de diferenciação (T10; adaptado de ZHANG et al., 2009).

3.5. Estímulos inflamatórios

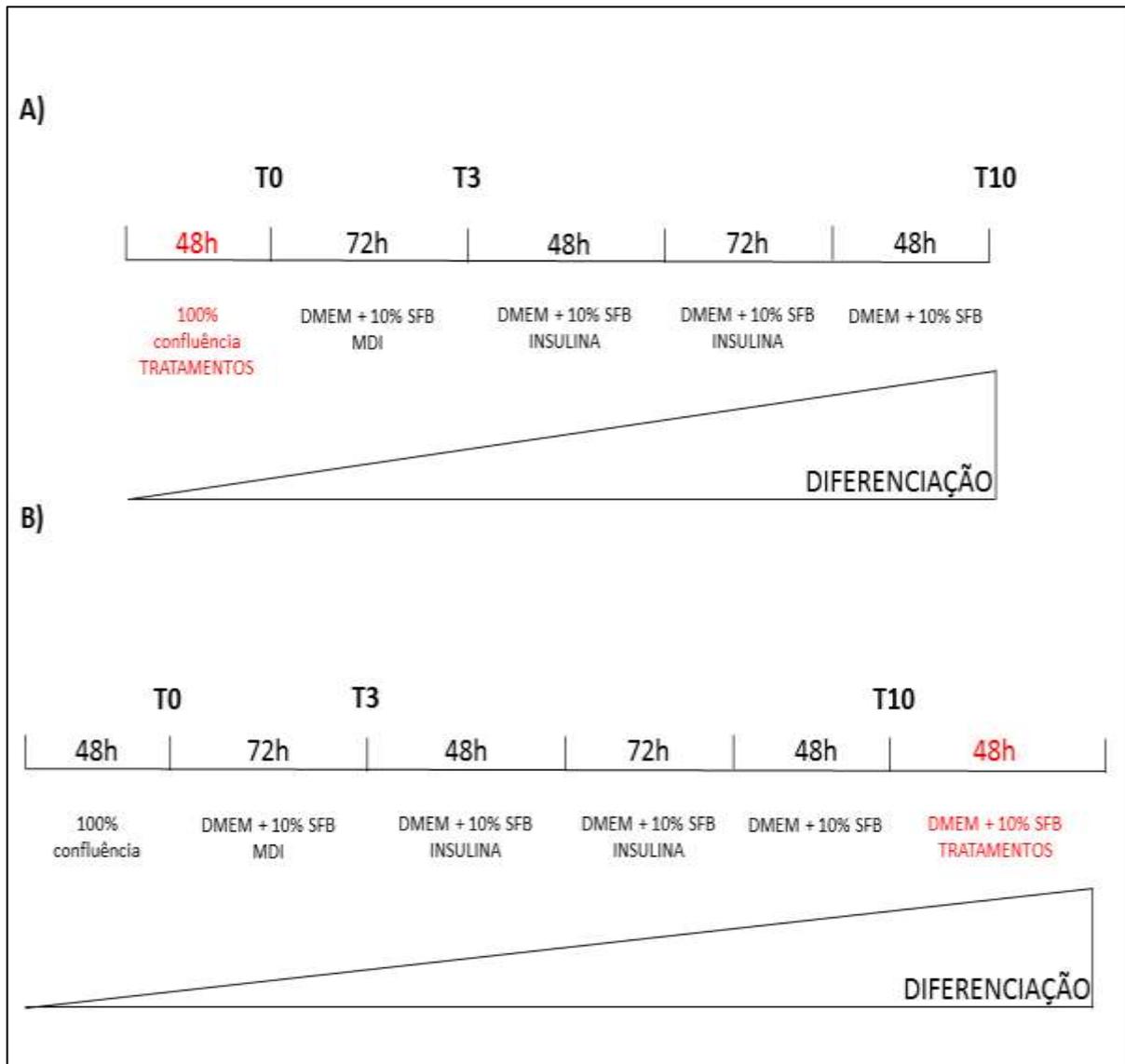
Para indução da resposta inflamatória em macrófagos primários e em células das linhagens 3T3-L1 e Raw 264.7, o LPS de *E. coli* (ATC 026B6 Sigma) foi empregado nas concentrações de 10, 100 ou 1000 ng/mL por 24 horas. Posteriormente, após as padronizações, o TNF- α (T7539, Sigma), uma citocina pró-inflamatória produzida e secretada por vários tipos celulares, tais como adipócitos e macrófagos, passou a ser empregado na concentração de 10 ng/mL por 48 horas (PALÁCIOS-ORTEGA et al., 2015).

3.6. Protocolos de tratamento

Inicialmente, o diazepam (Roche), um agonista de receptores benzodiazepínicos centrais e periféricos, foi utilizado, em diferentes tempos, nas concentrações de 1, 10, 100 ou 1000 nM, enquanto que o PK11195 (Sigma), um ligante de receptores benzodiazepínicos periféricos, de ação majoritariamente antagonista, foi utilizado nas concentrações de 1, 10 ou 100 nM (BENTO DE LIMA et al., 2012). Como veículo do diazepam e do PK11195, empregamos, primeiramente, o solvente dimetilformamida (DMF, *N,N-dimethylformamide*; Merck) diluído a 0,01%.

Posteriormente, após as padronizações, dois modelos de tratamento foram empregados para a realização dos ensaios, a saber: i) durante 48 horas após a confluência (100%) dos pré-adipócitos, antes do início da diferenciação (figura 2A) e, ii) durante 48 horas após o 10^o dia de diferenciação (T10) dos adipócitos (figura 2B; adaptado de LI et al., 2015). Para tanto, o diazepam foi utilizado nas concentrações de 5, 10 ou 20 μ M (LI et al., 2015), enquanto que o clonazepam (Roche), um ligante de receptores benzodiazepínicos centrais (GABA_A), foi utilizado nas concentrações de 1, 10 ou 50 μ M (LEE et al., 2004). Como veículo do diazepam e do clonazepam empregamos o solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) diluído a 0,04% (LI et al., 2015).

Figura 2 – Protocolos de diferenciação das células 3T3-L1



Legenda: diferenciação de células da linhagem 3T3-L1 pelo uso do coquetel adipogênico contendo: isobutilmetilxantina (IBMX), dexametasona (DEX) e insulina. A) tratamento durante 48 horas após a confluência dos pré-adipócitos (pré48h). B) tratamento dos adipócitos durante 48 horas após o 10º dia de diferenciação (pós48h). No modelo pré48h as células foram coletadas em três diferentes tempos, a saber: tempo 0 (T0), tempo 3 (T3) e tempo 10 (T10).

Fonte: Autoria própria.

3.7. Avaliação da proliferação da linhagem 3T3-L1

Para determinar a taxa de proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . Após 72 horas, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos, e a cada 24 horas de incubação as células foram

removidas de suas respectivas placas com o auxílio de tripsina (Vitrocell). Em seguida, foram centrifugadas (10min; 600g), ressuspendidas em *phosphate buffered solution* (PBS), diluídas em Azul de Tripán, e contadas, por microscopia óptica, em câmara de Neubauer, após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

3.8. Quantificação da viabilidade celular de pré-adipócitos por citometria de fluxo

Para avaliação da viabilidade celular, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram semeados na densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 24 poços e incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem aproximadamente 70% de confluência, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos. Em seguida, as células foram removidas da placa com o auxílio de tripsina, e incubadas com 100µl de anticorpo anti-Anexina V-FITC (BD biociences) por 20 minutos, e imediatamente, antes da leitura, 10 µL de Iodeto de Propídio (PI; Sigma) foi acrescentado. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Accuri™ C6 Plus (Becton Dickinson®) e os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA) pelo software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA).

3.9. Quantificação da concentração de nitritos pela reação de Griess

Para determinar a formação de NO pelas diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) utilizamos a reação de *Griess* (Green et al., 1982). Para tanto, os macrófagos primários obtidos da cavidade peritoneal de camundongos (1×10^6 células/poço), os pré-adipócitos 3T3-L1 e as células Raw 264.7 (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem a confluência específica para cada tipo celular, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos. Após as incubações, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (600g/10 min), e 50 µL de cada amostra foi distribuída em triplicatas em placa de 96 poços. Em seguida, 50 µL de sulfanilamida (Sigma) a 1% foi adicionado a cada poço da placa, que foi mantida no escuro, e em temperatura ambiente. Após

10 minutos, 50 µL de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED; Sigma) a 0,1% foi adicionado a cada poço da placa, que novamente foi mantida no escuro, e em temperatura ambiente por 10 minutos. O valor da absorbância foi mensurado a um comprimento de onda de 550 nm, e a concentração de nitritos nos sobrenadantes foi determinado a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) a 20 mM.

3.10. Avaliação da atividade mitocondrial de adipócitos 3T3-L1 por MTT

Para avaliar a viabilidade de adipócitos 3T3-L1 pela mensuração da atividade de enzimas redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas ou viáveis, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram semeados, cultivados (5% CO₂, 37°C) e diferenciados em placas para cultivo celular contendo 24 poços. Após o 10^o dia de diferenciação, os adipócitos 3T3-L1 maduros foram tratados ou não. Em seguida, o meio de cultura contendo os tratamentos foi armazenado em *freezer* -20°C, e as células foram incubadas com 100µl da solução de trabalho de MTT (0,5mg/mL) por 1 hora em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi descartada, as células foram lavadas com PBS estéril, e 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço. A placa foi mantida no escuro e sob agitação por 5 minutos. Após a dissolução dos cristais intracelulares, o conteúdo de cada poço foi transferido para poços correspondentes em uma placa de 96 poços, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro para placas Synergy H1 (Biotek) no comprimento de onda 570nm.

3.11. Expressão gênica de TSPO e/ou PPAR-γ na diferenciação e em adipócitos maduros da linhagem 3T3-L1

3.11.1. Extração de RNA total

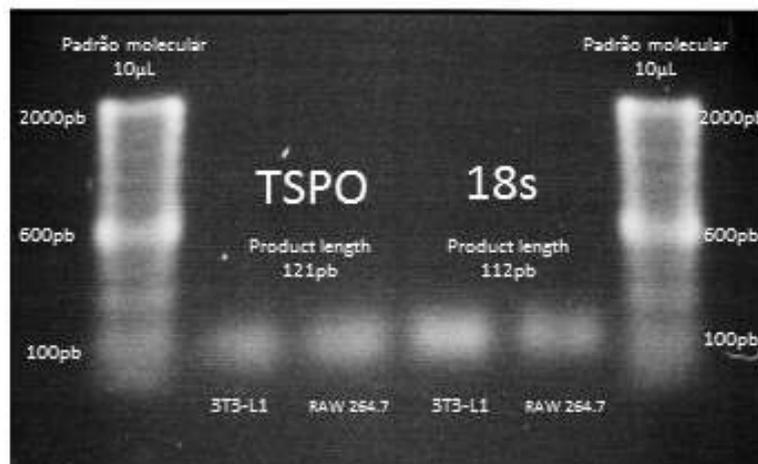
Para a expressão gênica de TSPO ou PPAR-γ, a extração de RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada em diferentes momentos, a saber: tempo 0 (T0), tempo 3 (T3), tempo 10 (T10) ou 48 horas após o 10^o dia de diferenciação. Para tanto, os RNAs foram extraídos com o *kit Rneasy*[®] (Qiagen Laboratories, Uniscience do Brasil, São Paulo) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os *pellets* de RNA foram ressuspensos em 40 µL de água livre de

DNase/RNase, quantificados pelo NanoDrop ND (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) e estocados à -80°C até o momento da análise por RT-PCR em tempo real.

3.11.2. Qualidade dos RNAs

Conforme citado anteriormente, os RNAs extraídos das culturas celulares foram quantificados pelo NanoDrop ND-1000, e a pureza e qualidade dos RNAs foram analisadas pela razão de absorbância 260/280 nm. A razão de absorbância 260/280 nm variou entre 1.8 e 2.0 e, portanto, não demonstrou haver possíveis contaminações protéicas e/ou por outros compostos orgânicos. A eletroforese em gel de agarose (figura 3), confirmou esta pureza e qualidade, apresentando bandas íntegras e de tamanho esperado.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose



Legenda: Gel de agarose (1%) evidenciando a pureza e qualidade dos RNAs extraídos das culturas celulares das linhagens 3T3-L1 e Raw 264.7 para os genes TSPO (121pb) e 18S (112pb).

Fonte: Autoria própria.

3.11.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Times – PCR*)

3.11.3.1. Preparação dos cDNAs

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Invitrogen, Carlsbad, Calif*) e diluídas para a síntese de DNA complementar (cDNA) por meio da reação da

transcriptase reversa (RT) utilizando o Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ (Invitrogen) e o *kit SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Os cDNAs foram armazenados em *freezer* -20°C e diluídos em água livre de DNase/RNase para 3,33 ng/μL.

3.11.4. qPCR para quantificação da expressão relativa

Para padronização do ensaio de PCR em tempo real, primeiramente estipulamos a melhor concentração de cDNA e de *primers*. Neste sentido, a concentração de escolha para os *primers* foi de 600 nM, enquanto que para o cDNA foi de 10 ng/mL na reação. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador (ABI *Prism® 7500 Sequence Detection System Applied Biosystem, New Jersey, EUA*) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e alongação dos *primers* a 60°C por 1 minuto.

Para a reação de PCR em tempo real, os cDNAs foram diluídos na concentração de 3,33 ng/μL. As reações foram realizadas com volume final de 12 μL, contendo 3 μL da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) na concentração de 600 nM, 3 μL de cDNA e 6 μL de SYBR®-Green (*Universal PCR Master Mix*). Foram utilizados *primers* para os genes de interesse TSPO (FAN; PAPADOPOULOS, 2012) e PPAR-γ2 (FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012), e como controle interno foi utilizado o 18S (sequência de oligonucleotídeo escolhida com o auxílio do *software Primer3* (UNTERGASSER; NEIJVEEN et al., 2007), a partir das sequências gênicas disponíveis no banco de genes do NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov)). A sequência dos *primers* utilizados encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

	Foward	Reverse
TSPO	5' TGTGAAACCTCCCAGCTCTTTCCA 3'	5' TAGCTTGCAGAAACCCTCTTGGCA 3'
PPAR γ 2	5' CACAGAGATGCCATTCTGGC 3'	5' GGCCTGTTGTAGAGCTGGGT 3'
18S	5' GTAACCCGTTGAACCCCAT 3'	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'

Legenda: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

Fonte: Autoria própria.

Para análise da expressão gênica pelo PCR em tempo real foi utilizado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta Ct$). Neste sentido, para utilização do método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$, foi necessário, primeiramente, comparar a eficiência de amplificação dos genes, subtraindo os valores de Ct do gene alvo pelos valores de Ct do gene controle. Em seguida, foi feito um gráfico da diferença contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, justificando-se assim a utilização deste método de análise de expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.12. Quantificação da expressão protéica de TSPO e PPAR- γ por Western blotting

Para a quantificação da expressão protéica de TSPO ou PPAR- γ por *Western blotting*, as células 3T3-L1 foram tratadas e a coleta das células 3T3-L1 foi realizada em diferentes momentos, a saber: tempo 0 (T0), tempo 3 (T3), tempo 10 (T10), e 48 após o 10^o dia de diferenciação. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (10 min, 4°C, 600g) e ressuspensas em 100 μ l de tampão de lise RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,4, SDS 0,05%) contendo inibidor de protease (*protease inhibitor cocktail tables* – Roche, Mannheim, Germany) e fosfatases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras foram imediatamente armazenadas em freezer -20°C para posterior normatização pelo método de Bradford (1976). Para a separação protéica foi utilizado o gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Para tanto, foi adicionado 20 μ g de extrato proteico total em 20 μ l de tampão de lise e 5 μ l

de tampão de amostra 5x (Tris-HCl 62,5 mM pH 6.7, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50 mM). As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e 5 µl de peso molecular *Rainbow* (RPN800V, *Amersham Pharmacia Biotech*, NJ, USA) foi adicionado a cada gel. A corrida foi realizada por 2 horas e meia (100V). Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia Biotech*, NJ, USA) por transferência úmida (100V, 2 horas, 4°C). As membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado em pó a 5% em TBS-t 1x (Tris 200 mM, NaCl 1,37 M, H₂O destilada, pH 7,6) e 0,05% de *Tween 20* (Roche) por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos monoclonais anti-PBR (EPR5384, Abcam), na diluição 1:10000, e anti-PPAR-γ (ab27649, Abcam), na diluição 1:1000, ambos, em TBS-t 1x contendo 3% de leite desnatado em pó. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-t 1x e incubadas com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado a enzima HRP na diluição 1:10000 em leite desnatado em pó a 3% por 2 horas em temperatura ambiente. Um ensaio de quimioluminescência (HRP *Super Signal West Pico*; *Pierce, USA*) foi utilizado para detectar as bandas imunorreativas. As intensidades das bandas foram estimadas por análise de densitometria pelo *software ImageJ* (1.48v, USA) e foram comparadas com a intensidade da expressão protéica de β-actina.

3.13. Determinação do acúmulo de triacilglicerol em adipócitos 3T3-L1

Para determinar o acúmulo de triacilglicerol em adipócitos 3T3-L1, os adipócitos 3T3-L1 foram tratados e, posteriormente, lavados com PBS estéril a 37°C e fixados com formalina (10% de formaldeído e 90% de PBS estéril) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 4x com água destilada e coradas com solução de *Oil Red O* (5 mg/mL em isopropanol:água, 2:1) por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com água e analisadas em microscópio de luz invertido (Leica DMI 4000B). Após a análise microscópica, o conteúdo de corante intracelular foi dissolvido em metanol e submetido a leitura em espectrofotômetro a 490nm (*Molecular Devices – Spectra Max 190*).

3.14. Citometria de fluxo: quantificação da expressão protéica de TSPO, F4/80, MHC de classe II e CD 23 em macrófagos primários

Para a quantificação da expressão protéica de TSPO, macrófagos primários obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, foram semeados na densidade de 1×10^6 células/poço em placas para cultura celular contendo 12 poços. Na sequência, as células foram tratadas com diazepam ou veículo (2, 4 ou 24 horas) ou estimuladas pelo LPS (1 hora). Após os tratamentos, as células foram removidas da placa com o auxílio de *cell scraper*, fixadas e permeabilizadas pelo *kit Cytotfix/Cytoperm* (BD Biosciences), e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-PBR (Abcam, diluição 1:100) por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. Por último, as células foram incubadas com o anticorpo secundário *Goat Anti-Rabbit IgG* (Abcam) conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE, diluição 1:200) por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente.

Para avaliar se o tratamento com diazepam ou veículo foi capaz de polarizar macrófagos primários obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, 1×10^6 células/poço foram semeadas e tratadas com Diazepam ou veículo por 24 horas em placas para cultura celular contendo 12 poços. Em seguida, as células foram removidas da placa com o auxílio de *cell scraper*, e incubadas por 30 minutos no escuro e, em temperatura ambiente, com os anticorpos monoclonais *Anti-Mouse F4/80 Antigen PE-Cyanine 5* (ebioscience), *Anti-MHC Class II FITC* (BD Bioscience) e *Anti-Mouse CD 23 PE* (ebioscience).

Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto® (*Becton Dickinson*®) e os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple, San Jose, CA, USA*) pelo *software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA)*.

3.15. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio em células Raw 264.7 e 3T3-L1

Para mensurar a produção de radicais livres nas linhagens 3T3-L1 e Raw 264.7, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^4

células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após atingir a confluência, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas (30 minutos, 37°C) com PBS suplementado com 10% de CS e DCFH (*dichlorofluorescein diacetate* - DCFH), uma sonda apolar não fluorescente que ao se difundir para o interior da célula é enzimaticamente deacetilado e oxidado por esterases intracelulares e radicais livres de oxigênio em um composto polar, estável por muitas horas no interior da célula, e altamente fluorescente (2'-7'-*dichlorofluorescein* – DCF; VOWELLS et al., 1995; BASS et al., 1983). A intensidade de fluorescência foi detectada utilizando o espectrofotômetro *Synergy H1* (Biotek) nos comprimentos de ondas: Exc. 488; Em. 530.

3.16 Ensaio de fagocitose com Zimosan A

Para avaliar a atividade fagocítica de macrófagos da linhagem Raw 264.7, as células Raw 264.7 foram semeadas em lamínulas circulares estéreis (13mm de diâmetro) na densidade de 1×10^4 células/lamínula e depositadas em placas de 12 poços. Vinte e quatro horas antes do início da captura das imagens, as células foram tratadas. No dia da captura das imagens de fagocitose, o reagente Zimosan A (pHrodo™ *Green Zymosan A Bioparticles*® conjugate, Life Technologies, Eugene, OR, USA), foi utilizado para avaliar a capacidade fagocítica das células Raw 264.7, que foram lavadas para retirada dos tratamentos e, em seguida, incubadas com 500µg/mL de solução de Zimosan A, em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, protegido da luz, por 60 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS estéril por 3 vezes (600g, 10min), e incubadas com 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) a 3% para identificação do núcleo celular. Após as incubações, as células foram novamente lavadas com PBS estéril por 3 vezes (600g, 10min), recobertas em solução balanceada de *Hank's* (HBSS), e as imagens da fluorescência emitida pelo Zimosan A foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência (*AxioVision*®, Carl-Zeiss, Germany). As imagens foram analisadas utilizando o software Zen 2012 (versão 1.1.1.0, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha), a quantidade de células em fagocitose foi quantificada, e o resultado foi representado como porcentagem de células marcadas com Zimosan A em relação ao número total de células na imagem.

3.17. Quantificação do glicerol livre

A quantificação de glicerol livre foi realizada nos sobrenadantes de adipócitos 3T3-L1, utilizando kits comerciais para determinação da lipólise por espectrofotometria (MILIPORE, Cat. OB100).

3.18. Quantificação de mediadores inflamatórios

A quantificação das concentrações de TNF- α , IL-6 e MCP-1 foi realizada nos sobrenadantes de pré-adipócitos e adipócitos maduros, utilizando *kits* comerciais para reação imunoenzimática (ELISA; BD Pharmigen).

3.19. Análise estatística

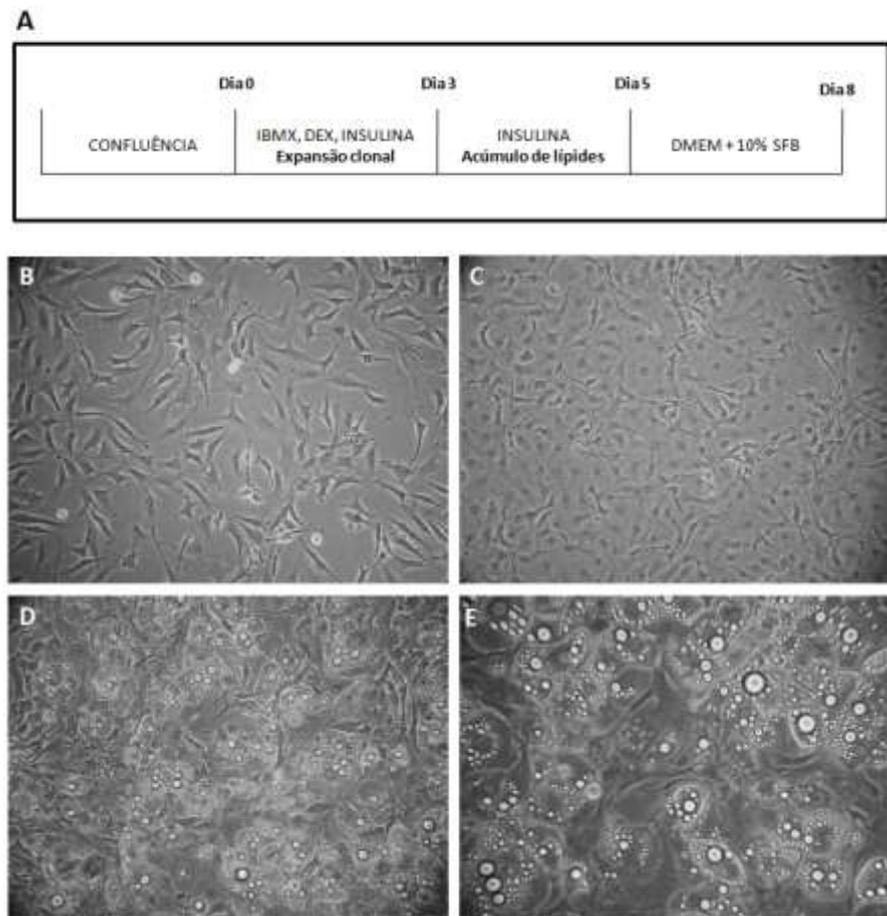
Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente pela análise da variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, quando necessário, foi utilizado o teste de *Tukey-Kramer* (SOKAL; ROHLF, 1995). Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism*[®], admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. SEÇÃO 01: ensaio para diferenciação de células 3T3-L1

A diferenciação de células da linhagem 3T3-L1 é um processo altamente complexo. O pré-adipócito confluyente, morfologicamente semelhante a um fibroblasto, torna-se esférico, acumula lípidos em pequenas gotículas, e torna-se um adipócito maduro (ZHANG et al., 2009). Os resultados obtidos no presente estudo ressaltam claramente este processo, conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros



Legenda: (A) Protocolo para diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros. (B) Células subconfluentes em meio de propagação. (C) Células confluentes foram estimuladas com coquetel adipogênico por 72 horas. (D) Adipócitos diferenciados estimulados com insulina por 48 horas. (E) Adipócitos já diferenciados após 8 dias de estímulo. Isobutimetilxantina (IBMX); dexametasona (DEX); *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM); soro fetal bovino (SFB).

Fonte: esquema ilustrativo adaptado de Monteiro, Fabíola Branco Filippin (2010).

4.2. SEÇÃO 02: expressão gênica de TSPO em células 3T3-L1 e Raw 264.7: ensaios de RT-PCR em tempo real

Para determinar a expressão gênica de mRNA de TSPO por RT-PCR em tempo real, primeiramente foi realizado a validação do método de análise descrito por Livak & Schmittgen (2001), e a partir dos dados de amplificação das diluições dos cDNAs foi calculado o ΔCt do gene TSPO ($Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{constitutivo}}$) em relação ao gene controle 18S. O ΔCt foi utilizado para construir um gráfico contra o logaritmo da concentração de cDNA e para o cálculo da regressão linear destas curvas. Se a inclinação da reta (*slope*) for menor que 0,1 a eficiência de amplificação do controle interno e do gene de interesse são comparáveis, podendo ser utilizado para avaliação das expressões gênicas dos genes em questão. A tabela 2 valida a utilização do método de $\Delta\Delta Ct$ para análise da expressão gênica de TSPO nas células 3T3-L1 e Raw 264.7, uma vez que a inclinação da reta foi menor que 0,1, mostrando que a eficiência de amplificação do gene alvo é semelhante à eficiência de transcrição do controle interno (18S). Adicionalmente, o valor de R^2 foi próximo a 1, mostrando também correlação positiva entre as variáveis, ou seja, entre o gene de interesse e o controle interno 18S (figura 5A e B).

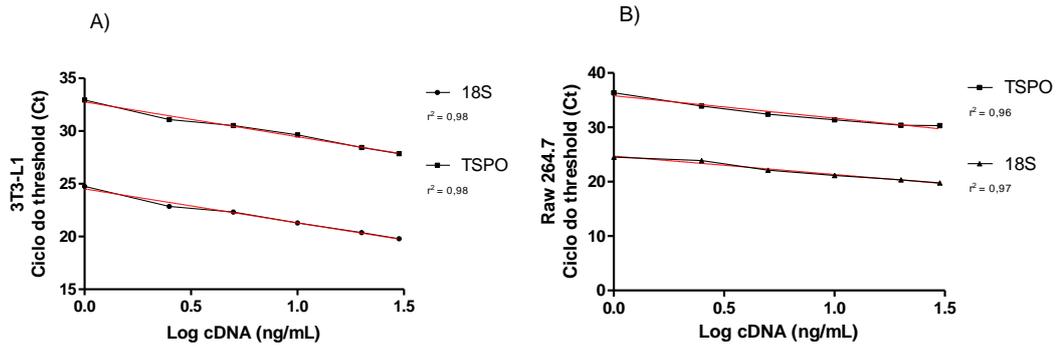
Após a validação, determinou-se a expressão gênica de mRNA de TSPO em células da linhagem 3T3-L1 e Raw 264.7 na ausência de tratamentos com ligantes de TSPO. A figura 6 mostra a expressão gênica de TSPO em células da linhagem 3T3-L1 e Raw 264.7. Os resultados obtidos corroboram o estudo de Wade e colaboradores (2005), demonstrando uma regulação positiva de fitas complementares de mRNA de TSPO 18kDa durante a adipogênese.

Tabela 2 – Valor de *slope* do gene TSPO para validação experimental

Linhagem	Gene	Validação (<i>slope</i> < 0,1)
3T3-L1	TSPO	- 0,07
Raw 264.7	TSPO	- 0,72

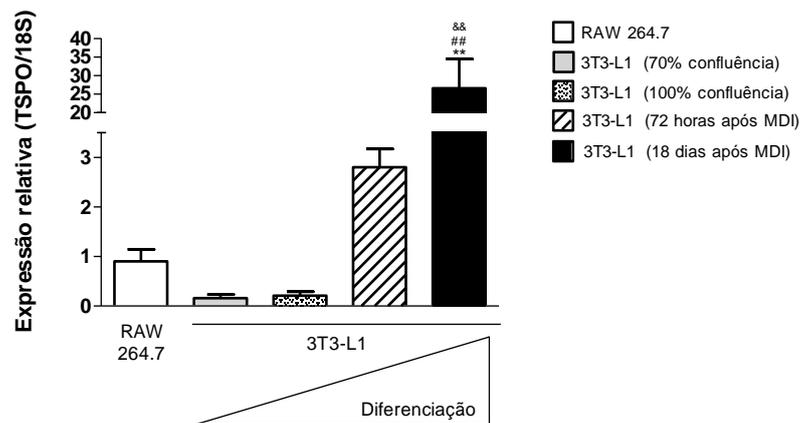
Legenda: Valor de *slope* do gene TSPO para validação experimental pelo método de $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Notar que para validação, os valores de *slope* ou inclinação da reta devem ser inferiores a 0,1.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5 – Eficiência de amplificação dos genes TSPO e 18S

Legenda: Eficiência de amplificação dos genes TSPO e 18S para a linhagem de células 3T3-L1 (A) e Raw 264.7 (B). Diferentes concentrações de cDNA foram amplificadas por RT-PCR quantitativo usando *primers* específicos. Os dados foram ajustados usando análise de regressão linear. Notar os valores de R^2 próximo a 1 para inclinação da reta.

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Expressão gênica quantitativa de TSPO em células 3T3-L1 e Raw 264.7

Legenda: Expressão gênica quantitativa de TSPO. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; && $p < 0,01$.

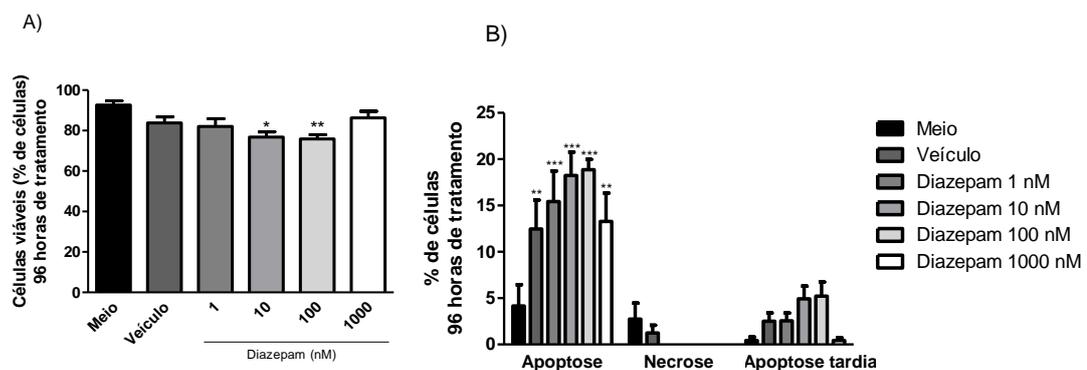
Fonte: Autoria própria.

4.3. SEÇÃO 03: ensaios com pré-adipócitos 3T3-L1 tratados com diazepam (1, 10, 100 ou 1000 nM) ou LPS (10, 100 ou 1000 ng/mL)

4.3.1. Ensaio para quantificação da viabilidade celular de pré-adipócitos

Para quantificar a viabilidade de células 3T3-L1 tratadas por 96 horas com diazepam ou veículo (DMF 0,01%), os pré-adipócitos foram incubados com o anticorpo anti-Anexina V-FITC e, imediatamente, antes da leitura, com o corante Iodeto de Propídio (PI). Os resultados obtidos mostraram que a viabilidade das células tratadas com 10 ou 100 nM de diazepam, em 96 horas, foi significativamente reduzida para 76 e 75% (figura 7A), e que todos os grupos de células tratadas com diazepam ou veículo apresentaram aumento significativo de morte por apoptose, excetuando-se as células que foram incubadas com o meio de cultura (figura 7B). As mortes por necrose e apoptose tardia não foram estatisticamente diferentes do grupo de células tratadas com meio de cultura (figura 7B).

Figura 7 – Quantificação da viabilidade celular por citometria de fluxo



Legenda: (A) Porcentagem de células viáveis. (B) Porcentagem de células em apoptose, necrose e/ou apoptose tardia. Os pré-adipócitos foram tratados por 96 horas com diazepam (1, 10, 100 e 1000nM) e/ou seu respectivo veículo (DMF 0,01%). Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

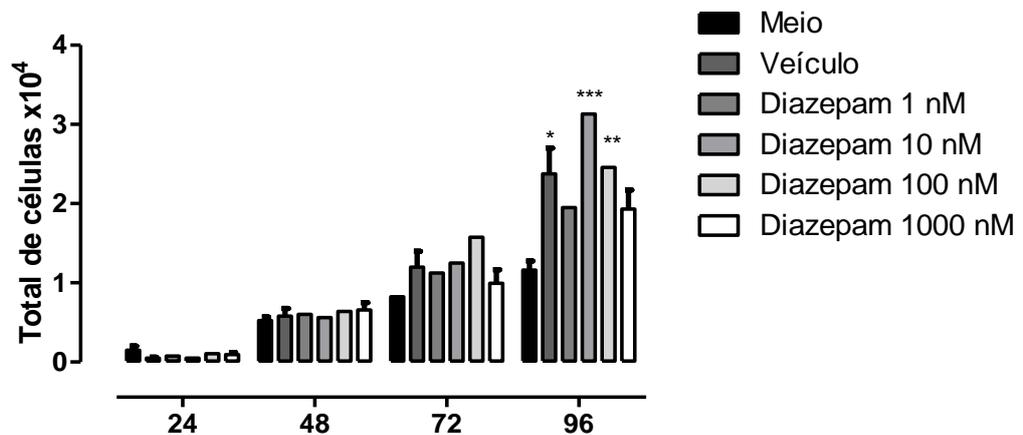
Fonte: Autoria própria.

4.3.2. Ensaio para avaliação da taxa de proliferação de pré-adipócitos

A proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1 tratados com diazepam ou veículo (DMF 0,01%) foi avaliada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após o início dos tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que a proliferação das células 3T3-L1

não foi alterada pelo tratamento com diazepam após 24, 48 e 72 horas. No entanto, 96 horas após o início dos tratamentos, houve aumento significativo da proliferação de células tratadas com veículo ou diazepam 10 e 100 nM (figura 8).

Figura 8 – Avaliação da taxa de proliferação de pré-adipócitos

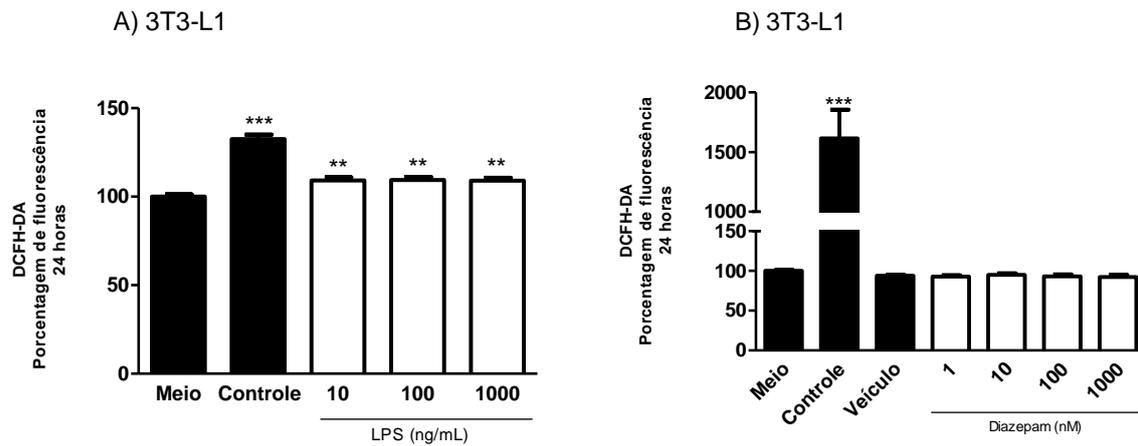


Legenda: Curva de crescimento das células da linhagem 3T3-L1. Os pré-adipócitos foram tratados ou não com Diazepam (1, 10, 100 e 1000nM) e/ou seu respectivo veículo (DMF a 0,01%) por 24, 48, 72 e 96 horas. Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

Fonte: Autoria própria.

4.3.3. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de pré-adipócitos

Os pré-adipócitos 3T3-L1, após serem tratados ou estimulados por 24 horas com diazepam ou LPS, respectivamente, foram incubados com PBS suplementado com 10% de CS e DCFH. Os resultados obtidos mostraram que a incubação dos pré-adipócitos com 10, 100 ou 1000 ng/mL de LPS aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (figura 9A). Adicionalmente, o tratamento com diazepam ou veículo não causou alterações na produção de radicais livres pelos pré-adipócitos (figura 9B).

Figura 9 – Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio

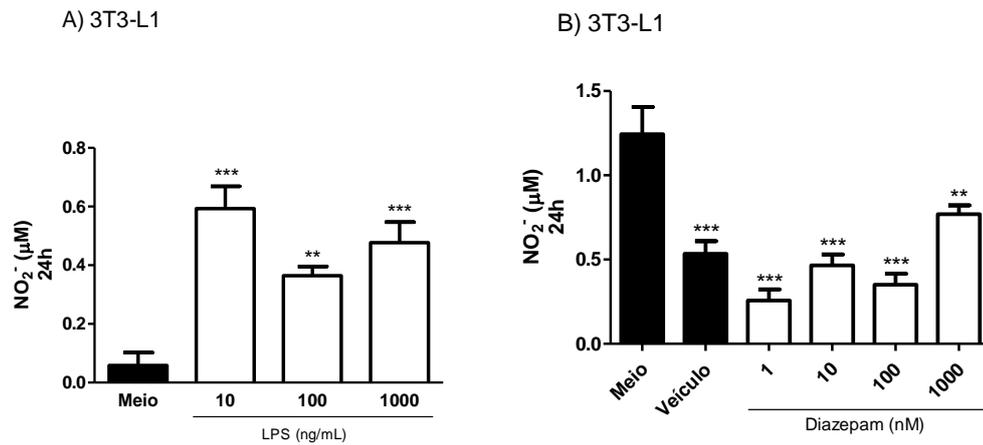
Legenda: (A) Porcentagem de fluorescência de células 3T3-L1 estimuladas com LPS. (B) Porcentagem de fluorescência de células 3T3-L1 tratadas com Diazepam. Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados e/ou estimuladas por 24 horas com diazepam, veículo e/ou LPS. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $10\mu M$). Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

Fonte: Autoria própria.

4.3.4. Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de pré-adipócitos

A formação de NO pelas diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase foi quantificada indiretamente pelo método de *Griess*. Para tanto, as células 3T3-L1 foram tratadas ou estimuladas por 24 horas com diazepam ou LPS. Os resultados obtidos mostraram que a estimulação das células 3T3-L1 com 10, 100 ou 1000 ng/mL de LPS aumentou a produção de NO (figura 10A), enquanto que o tratamento com 1, 10, 100 ou 1000 nM de diazepam ou DMF 0,01% (veículo do diazepam) diminuiram a produção de NO comparado as células tratadas somente com meio de cultura (figura 10B).

Figura 10 – Quantificação de nitritos pelo método de *Griess*

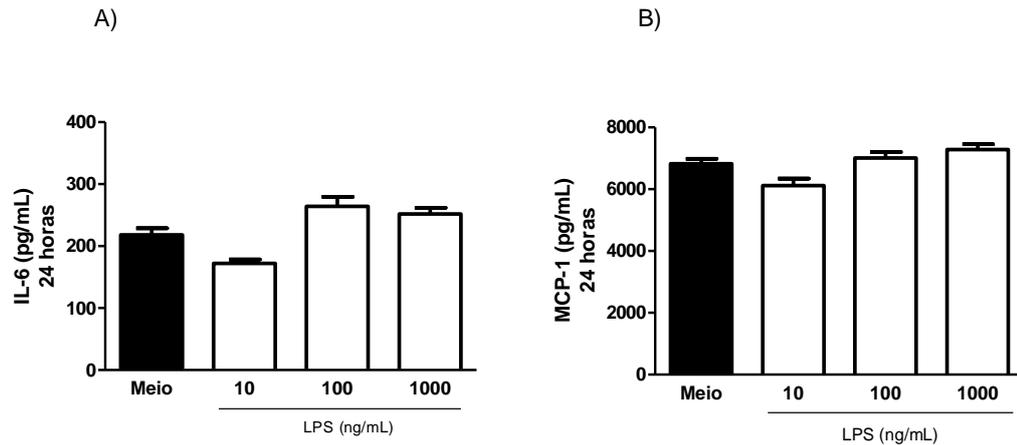


Legenda: (A) células 3T3-L1 estimuladas com LPS, (B) células 3T3-L1 tratadas com Diazepam e/ou DMF (veículo do Diazepam). Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

Fonte: Autoria própria.

4.3.4. Quantificação de mediadores inflamatórios

As concentrações dos mediadores TNF- α , IL-6 e MCP-1 foram quantificados nos sobrenadantes de pré-adipócitos 3T3-L1. Os resultados obtidos mostraram que a estimulação das células com 10, 100 ou 1000 ng/mL de LPS por 24 horas não induziu aumento da secreção de IL-6 (figura 11A) e MCP-1 (figura 11B). Adicionalmente, os níveis de TNF no sobrenadante das culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 foram indetectáveis.

Figura 11 – Quantificação dos níveis de IL-6 e MCP-1

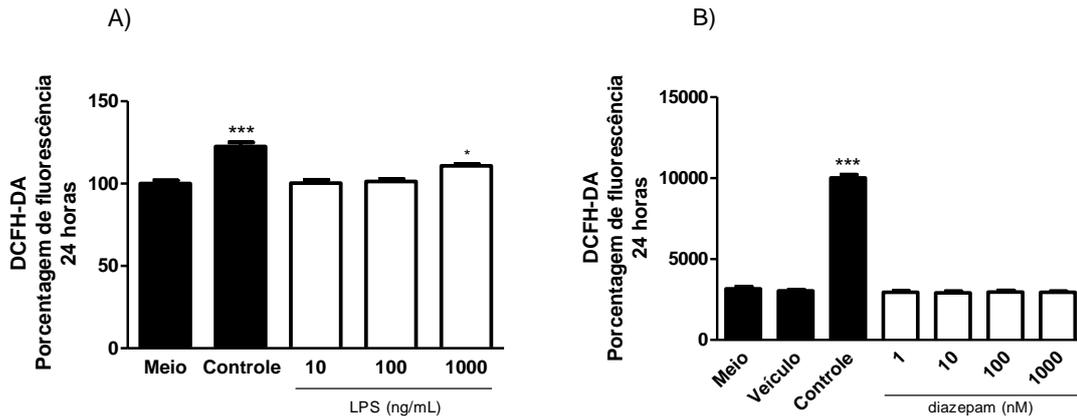
Legenda: (A) quantificação dos níveis de IL-6 e, (B) MCP-1 em sobrenadantes de culturas de pré-adipócitos 3T3-L1. As células foram estimuladas com 10, 100 e 1000ng/mL de LPS por 24 horas. Os níveis de TNF foram indetectáveis. Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes.

Fonte: Autoria própria.

4.4. SEÇÃO 04: ensaios com células da linhagem Raw 264.7 e macrófagos primários

4.4.1. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio no sobrenadante de células da linhagem Raw 264.7

Para a quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio, as células Raw 264.7, após serem tratadas ou estimuladas por 24 horas com diazepam ou LPS, foram incubadas com PBS suplementado com 10% de CS e DCFH. Os resultados obtidos mostraram que somente a concentração de 1000 ng/mL de LPS foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio comparado ao grupo que foi incubado somente com o meio de cultura (figura 12A), e nenhuma alteração foi evidenciada nas células tratadas com veículo ou diazepam (figura 12B).

Figura 12 – Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio

Legenda: (A) Porcentagem de células Raw 264.7 estimuladas com LPS. (B) Porcentagem de células Raw 264.7 tratadas com Diazepam. As células Raw 264.7 foram tratadas e/ou estimuladas por 24 horas com diazepam, veículo e/ou LPS. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $10\mu M$). Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

Fonte: Autoria própria.

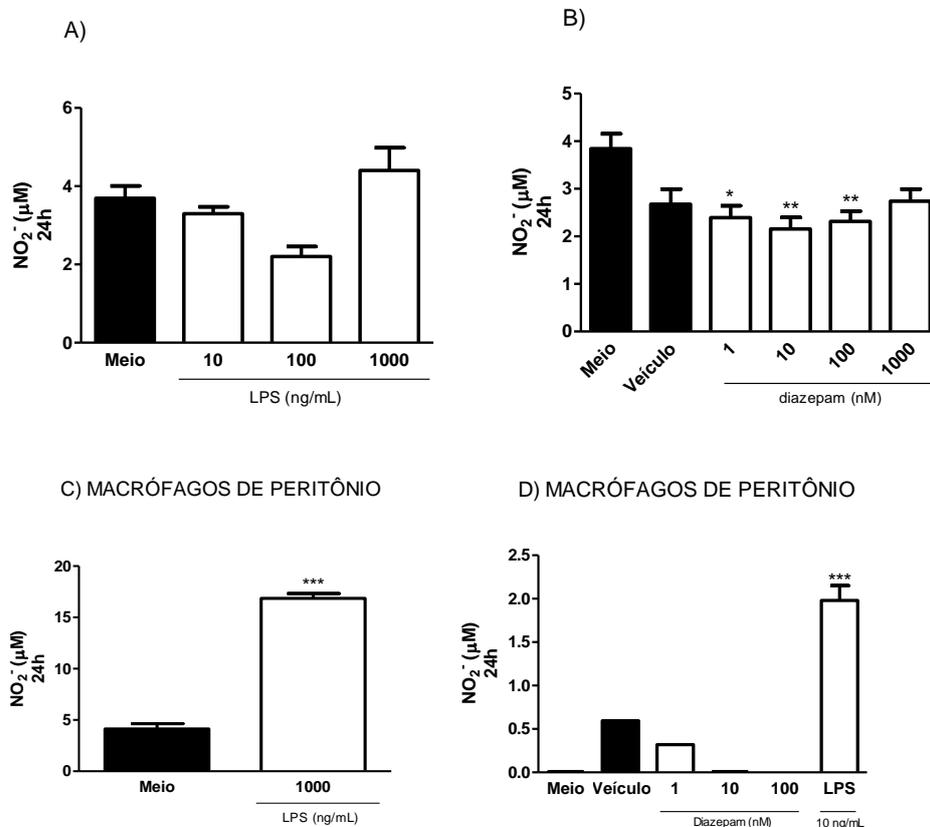
4.4.2. Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de células da linhagem Raw 264.7 e de macrófagos primários

As células Raw 264.7 foram tratadas ou estimuladas por 24 horas com diazepam ou LPS. Os resultados obtidos mostraram que a incubação com LPS, surpreendentemente, não aumentou a produção de NO (figura 13A), enquanto que o tratamento com 1, 10 ou 100 nM de diazepam, mas não o veículo, diminuiu a produção do NO comparado as células que foram incubadas somente com o meio de cultura (figura 13B).

Adicionalmente, macrófagos de peritônio foram semeados (1×10^6 cels/poço) em placas de 12 poços e incubados por 24 horas com diazepam, veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10 e 1000ng/mL). Em seguida, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (600g, 10min), e o acúmulo de nitritos foi quantificado nos sobrenadantes pela reação de *Griess*. Os resultados obtidos mostraram que, diferentemente das células Raw 264.7, a incubação das células com 10 ou 1000 ng/mL de LPS aumentaram, de maneira expressiva, a produção de NO pelos macrófagos obtidos do peritônio de camundongos Balb/c (figura 13C e 13D). Além disso, o tratamento com diazepam

mostrou novamente diminuir a produção de NO, neste caso, comparado as células que foram incubadas com o veículo (figura 13D).

Figura 13 – Quantificação de nitritos pelo método de *Griess*



Legenda: (A) células Raw 264.7 estimuladas com LPS, (B) células Raw 264.7 tratadas com Diazepam e/ou DMF (veículo do Diazepam), (C) macrófagos de peritônio estimulados com 1000 ng/mL de LPS (D) macrófagos de peritônio tratados com Diazepam e/ou DMF (veículo do Diazepam) e estimulados com 10ng/mL de LPS. Os dados representam média ± erro padrão da média (EPM) de seis experimentos independentes, excetuando-se a letra F, que representa apenas um experimento com n=3 animais em cada grupo. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs respectivo meio.

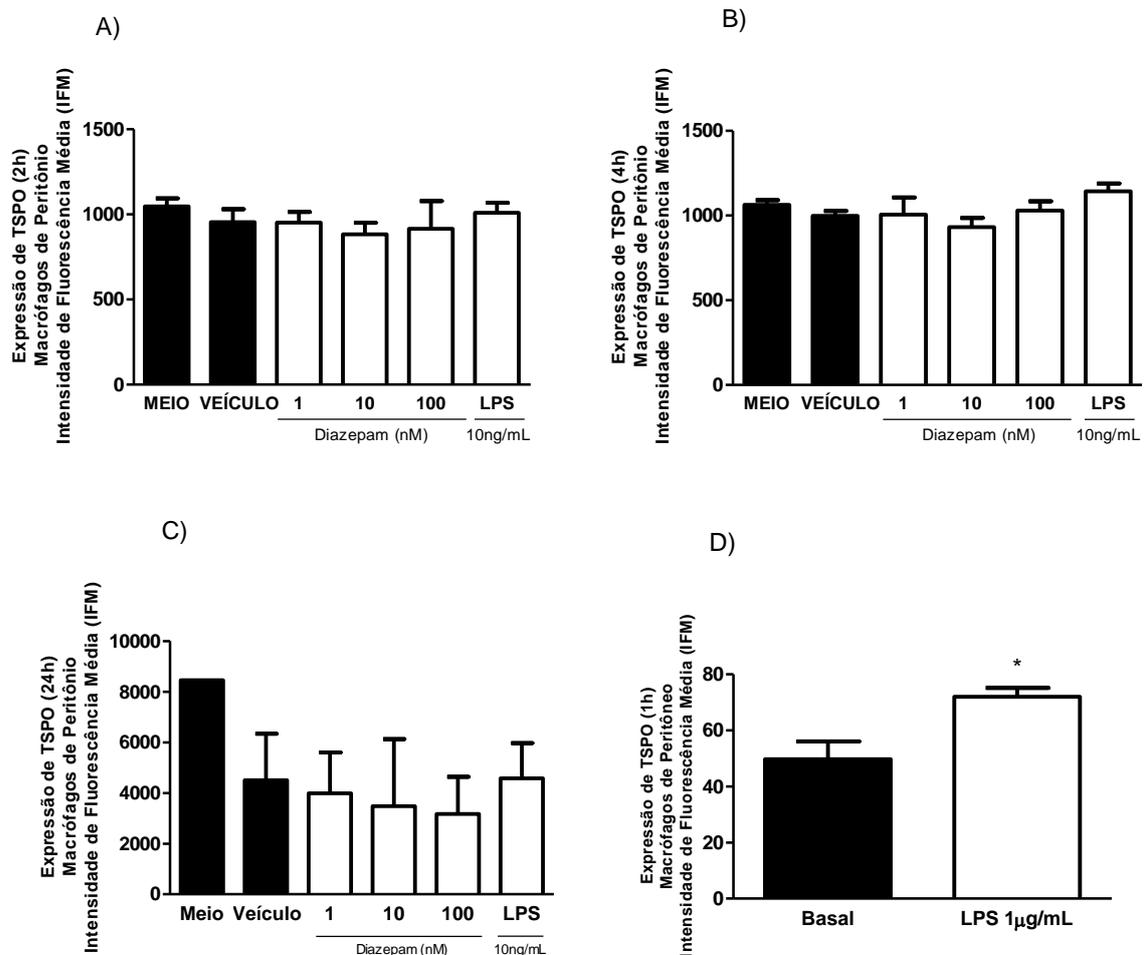
Fonte: Autoria própria.

4.4.3. Expressão protéica de TSPO em macrófagos primários

Para quantificar a expressão protéica de TSPO, macrófagos primários foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, após a injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio a 4%. As células, após terem sido plaqueadas e estarem

aderidas, foram tratadas com diazepam, veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10 ng/mL) em diferentes tempos, a saber: 2, 4 ou 24 horas. Adicionalmente, outro grupo de macrófagos de peritônio foi estimulado com 1000 ng/mL de LPS, uma concentração 100 vezes maior que a concentração de LPS que utilizamos inicialmente. Os resultados obtidos mostraram que o diazepam, bem como a concentração de 10 ng/mL de LPS, não modificaram a expressão protéica de TSPO nos três diferentes tempos (figuras 14A, B e C), enquanto que a estimulação dos macrófagos com 1 µg/mL de LPS por 1 hora modulou positivamente a expressão protéica de TSPO (figura 14D).

Figura 14 – Expressão protéica de TSPO em macrófagos primários



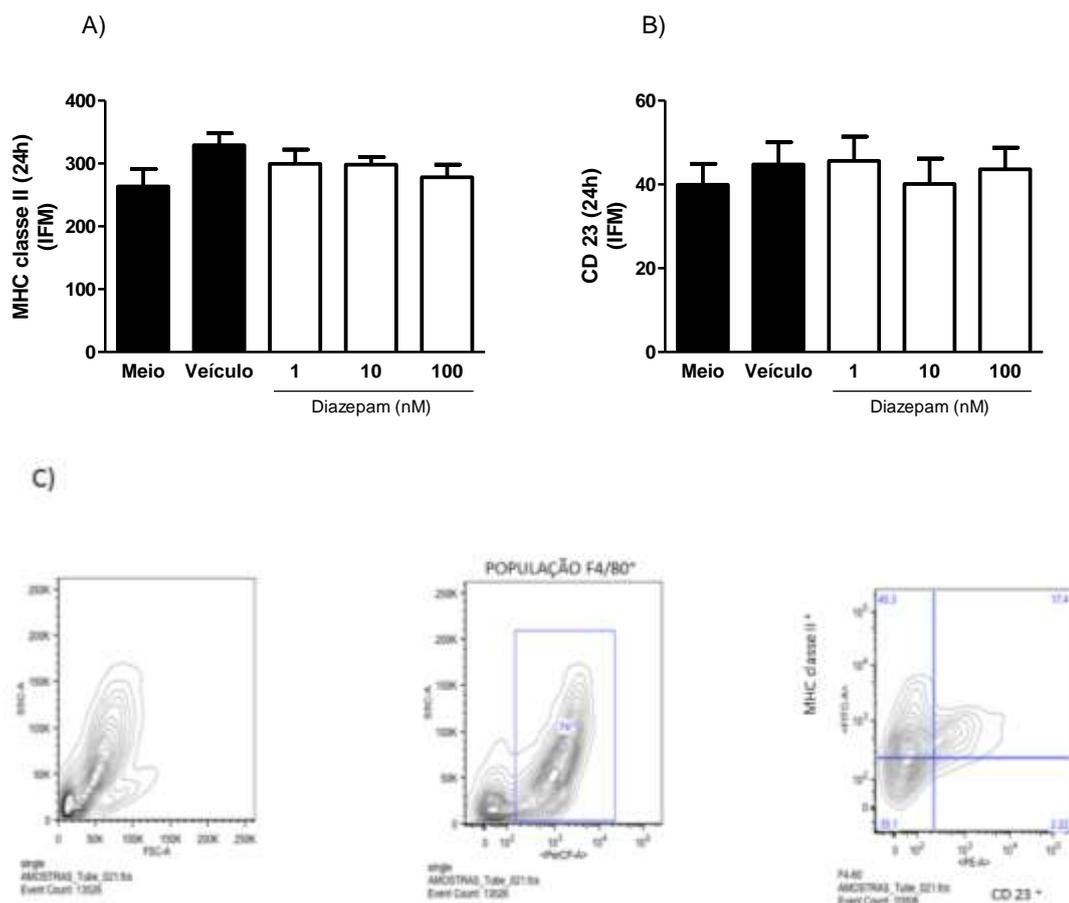
Legenda: expressão protéica de TSPO em macrófagos primários obtidos do peritônio. (A) 2 horas, (B) 4 horas ou (C) 24 horas de tratamento com Diazepam (1, 10 e 100 nM), veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10 ng/mL). (D) Expressão protéica de TSPO em macrófagos primários estimulados com 1 µg/mL de LPS. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de um único experimento com $n=3$ animais em cada grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio (basal).

Fonte: autoria própria.

4.4.4. Expressão protéica de F4/80, MHC de classe II e CD23 em macrófagos primários

Para avaliar se o tratamento com diazepam alterou a expressão protéica de MHC de classe II e CD 23 em macrófagos primários obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, as células após terem sido plaqueadas e estarem aderidas, foram tratadas com diazepam ou veículo (DMF 0,01%) por 24 horas. Nossos resultados mostraram 74% de células positivas para F4/80 (figura 15C), uma proteína amplamente expressa em macrófagos diferenciados; fato que validou nosso recrutamento celular pelo tioglicolato de sódio a 4% e, ainda, que as diferentes concentrações de diazepam empregadas, bem como o veículo, não alteraram a intensidade de expressão protéica dos receptores MHC de classe II (figura 15A) e CD 23 (figura 15B).

Figura 15 – Expressão protéica de F4/80, MHC de classe II e CD 23



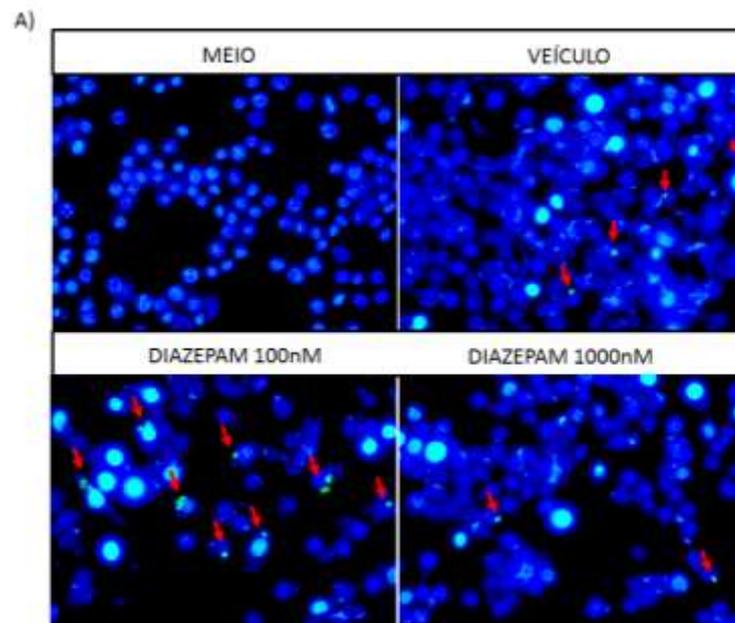
Legenda: (A) expressão protéica de MHC de classe II (Intensidade de Fluorescência Média – IFM). (B) expressão protéica de CD23 (IFM). (C) porcentagem de macrófagos positivos para F4/80 (figura central). Os macrófagos primários obtidos do peritônio foram tratados com Diazepam (1, 10 e 100nM) ou veículo por 24 horas. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de um único experimento com n=3 animais em cada grupo.

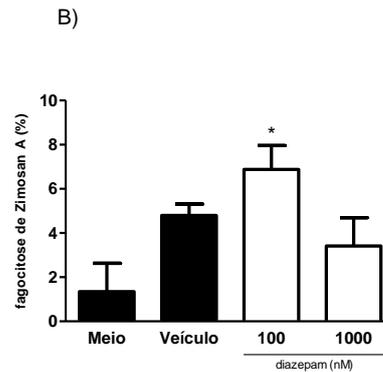
Fonte: autoria própria.

4.4.5. Ensaio para quantificação da fagocitose com Zimosan A

A atividade fagocítica de macrófagos da linhagem Raw 264.7 tratados com diazepam (100 ou 1000 nM) ou veículo (DMF 0,01%) foi quantificada por microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento das células por 24 horas com 100 nM de diazepam aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos, enquanto que os tratamentos com veículo ou 1000 nM de diazepam não alteraram este comportamento (figuras 16A e B).

Figura 16 – Quantificação da fagocitose com Zimosan A





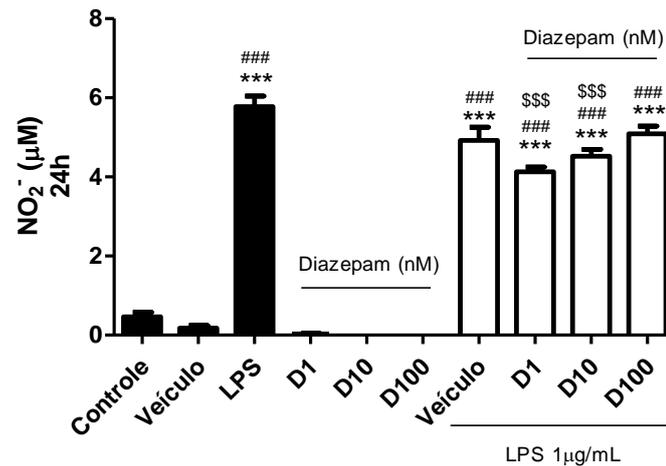
Legenda: Quantificação da fagocitose com Zimosan A. As imagens foram analisadas utilizando o software Zen 2012 (versão 1.1.1.0, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha) e a quantidade de células em fagocitose foi contada e o resultado foi obtido em relação ao número total de células na foto. Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ vs respectivo meio.

Fonte: Autoria própria.

4.4.6. Ensaio para quantificação de nitritos nos sobrenadantes de macrófagos primários tratados simultaneamente com diazepam e LPS

Nossos resultados mostraram que o LPS aumentou significativamente a produção de NO, enquanto que o tratamento simultâneo com diazepam (1 ou 10 nM) reduziu este efeito. Ademais, a produção de NO pelas células não estimuladas pelo LPS, mas tratadas com diazepam (1, 10 ou 100 nM), foi significativamente menor comparado aos grupos de células incubadas somente com meio de cultura ou veículo (figura 17).

Figura 17 – Produção de NO por macrófagos primários



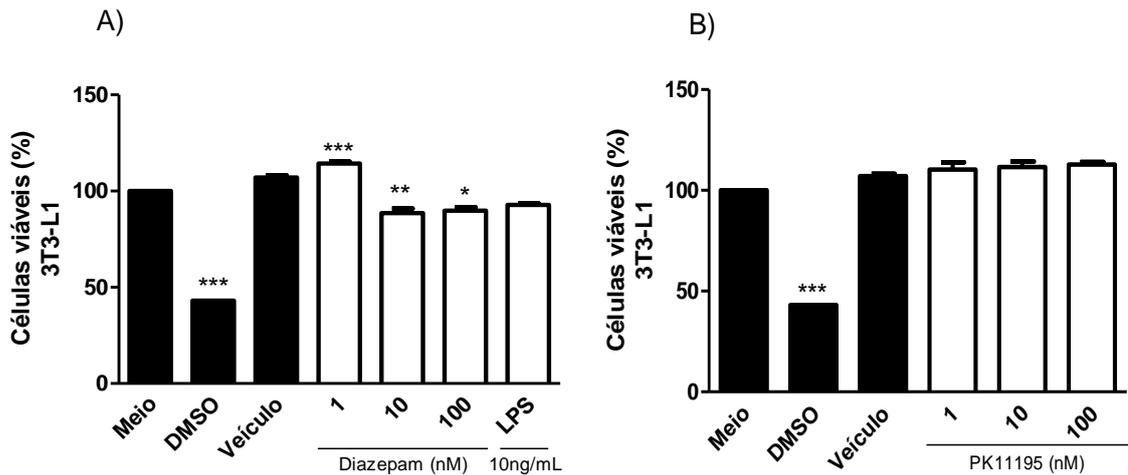
Legenda: macrófagos de peritônio estimulados e/ou tratados com LPS (1 µg/mL), Diazepam (1, 10 ou 100 nM) ou DMF (veículo do Diazepam), respectivamente. Os dados representam média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *** p < 0,001 vs controle (meio de cultura); ### p < 0,001 vs veículo; \$\$\$ p < 0,001 vs LPS.

Fonte: Autoria própria.

4.5. SEÇÃO 05: efeitos dos tratamentos com ligantes de TSPO ou LPS sobre a diferenciação de células 3T3-L1

4.5.1. Viabilidade por MTT

A viabilidade de adipócitos 3T3-L1 foi determinada indiretamente pela mensuração da atividade de enzimas mitocondriais em células metabolicamente ativas ou viáveis. Nossos resultados mostraram que no 18º dia de diferenciação o tratamento com diazepam (1 nM) aumentou em 14% a atividade das enzimas mitocondriais dos adipócitos comparado as células do grupo controle (100%, células incubadas somente com meio de cultura). Diferentemente, as incubações com concentrações maiores, 10 ou 100 nM de diazepam, reduziram este efeito em 11,5 e 10%, respectivamente (figura 18A). Ademais, nenhum sinal de toxicidade foi observado por microscopia óptica durante a diferenciação das células, e os tratamentos com PK11195 não afetaram a atividade mitocondrial dos adipócitos (figura 18B).

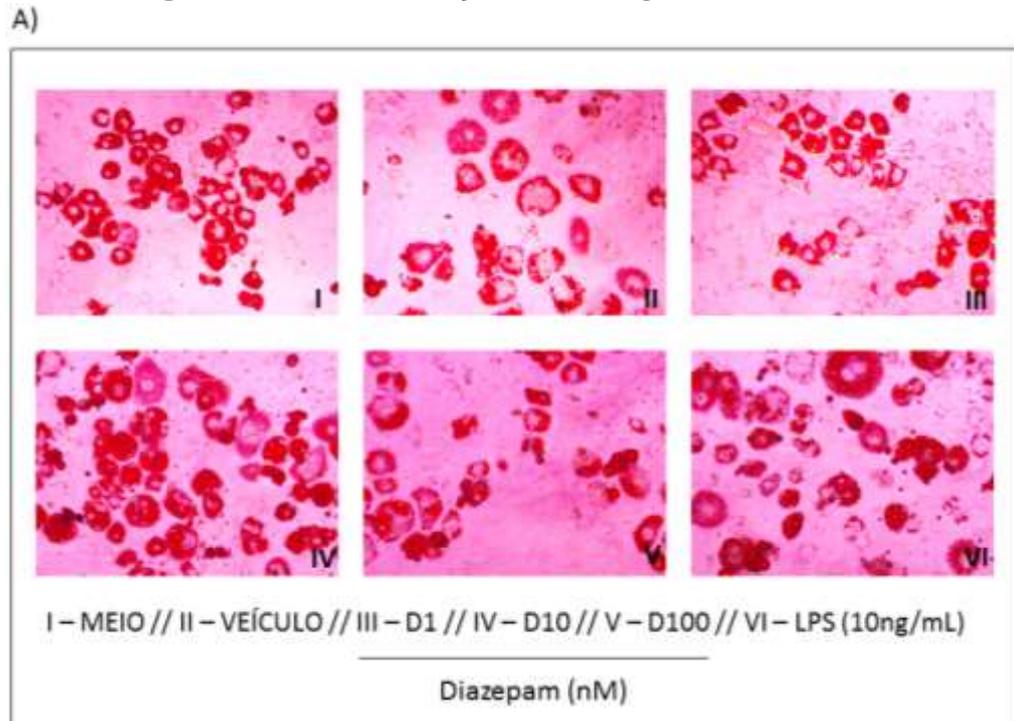
Figura 18 – Determinação da viabilidade celular por MTT

Legenda: a técnica de redução por MTT consiste na mensuração da atividade de enzimas redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas ou viáveis. Como controle positivo foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs meio.

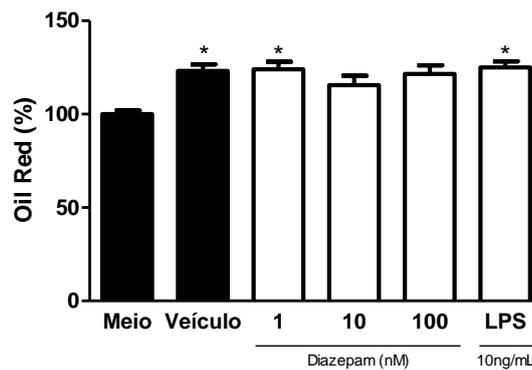
Fonte: autoria própria.

4.5.2. Acúmulo de triacilglicerol

No 18º dia de diferenciação, os adipócitos 3T3-L1 tratados com diazepam (1, 10 ou 100 nM), PK11195 (1, 10 ou 100 nM), veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10 ng/mL), foram corados pelo *Oil Red O* e fotografados ao microscópio óptico invertido Leica DMI 4000B (figuras 19A e 20A). Em seguida, o corante foi extraído e quantificado por espectrofotometria. Os resultados obtidos mostraram aumento da quantidade de resíduos de corante nos adipócitos tratados com veículo (23%) ou LPS (25%) (figuras 19B e 20B) e, ainda, que as concentrações de 10 ou 100 nM de diazepam, bem como as diferentes concentrações de PK11195, reverteram o acúmulo de triacilglicerol evidenciado nas células tratadas pelo veículo (figuras 19B e 20B).

Figura 19 – Determinação do triacilglicerol intracelular

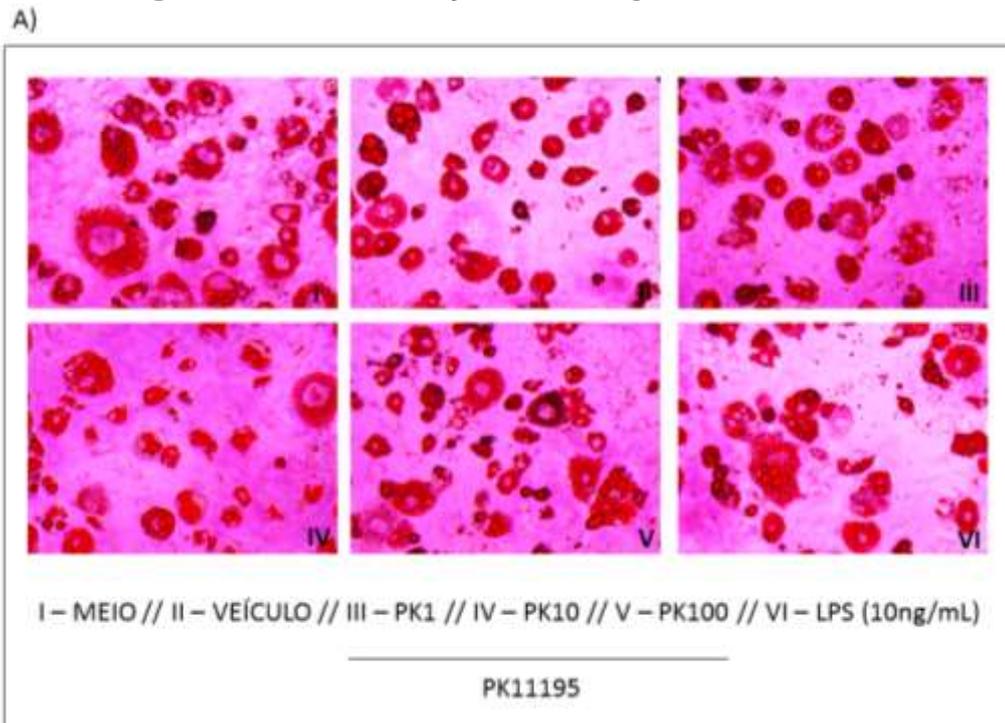
B)



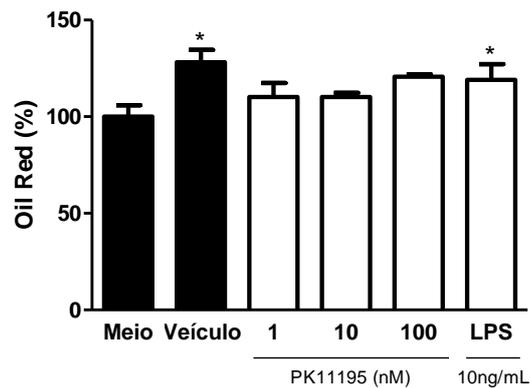
Legenda: determinação do triacilglicerol intracelular pela coloração com *Oil Red O*. (A) Fotos dos diferentes tratamentos, a saber: I) meio de cultura, II) veículo, III) diazepam 1nM, IV) diazepam 10nM, V) diazepam 100nM e, VI) LPS (10ng/mL). (B) Porcentagem de lipídeos corados com *Oil Red O*. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs meio.

Fonte: autoria própria.

Figura 20 – Determinação do triacilglicerol intracelular



B)



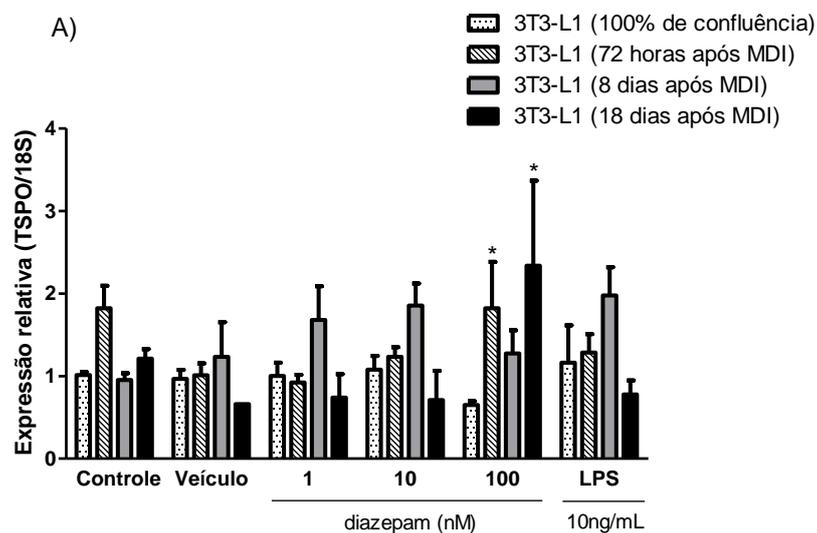
Legenda: determinação do triacilglicerol intracelular pela coloração com *Oil Red O*. (A) Fotos dos diferentes tratamentos, a saber: I) meio de cultura, II) veículo, III) PK11195 1nM, IV) PK11195 10nM, V) PK11195 100nM e, VI) LPS (10ng/mL). (B) Porcentagem de lipídeos corados com *Oil Red O*. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs meio.

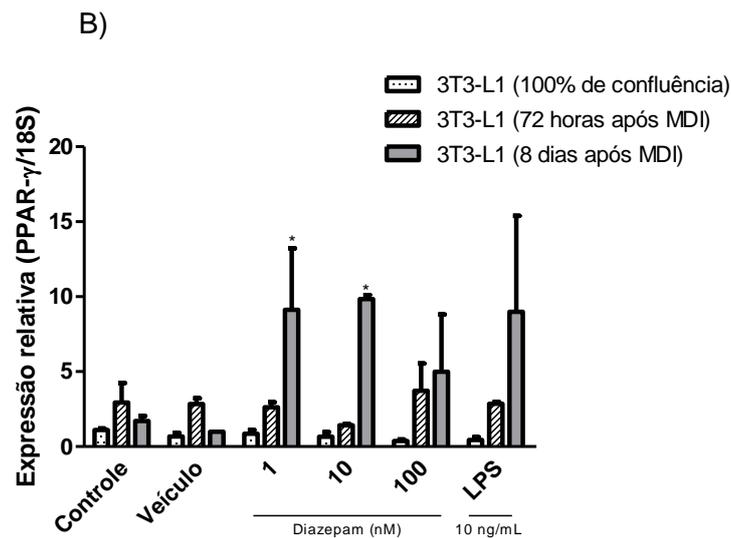
Fonte: autoria própria.

4.5.3. Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ

Para avaliar a expressão gênica de TSPO e PPAR- γ durante a diferenciação de adipócitos 3T3-L1, as células foram coletadas em diferentes tempos, a saber: dia 0 (100% de confluência), 3 (72 horas após a incubação inicial com MDI), 8 (8 dias após a incubação inicial com MDI), e 18 (18 dias após a incubação inicial com MDI). Os resultados obtidos mostraram que a concentração de 100 nM de diazepam modulou positivamente a expressão gênica de TSPO 72 horas ou 18 dias após incubação inicial pelo MDI (figura 21A), enquanto que as concentrações de 1 ou 10 nM de diazepam elevaram a expressão gênica de PPAR- γ somente no 8º dia após a incubação inicial pelo MDI (figura 21B).

Figura 21 – Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ





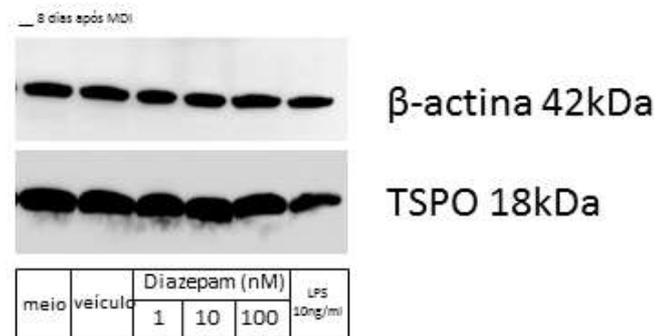
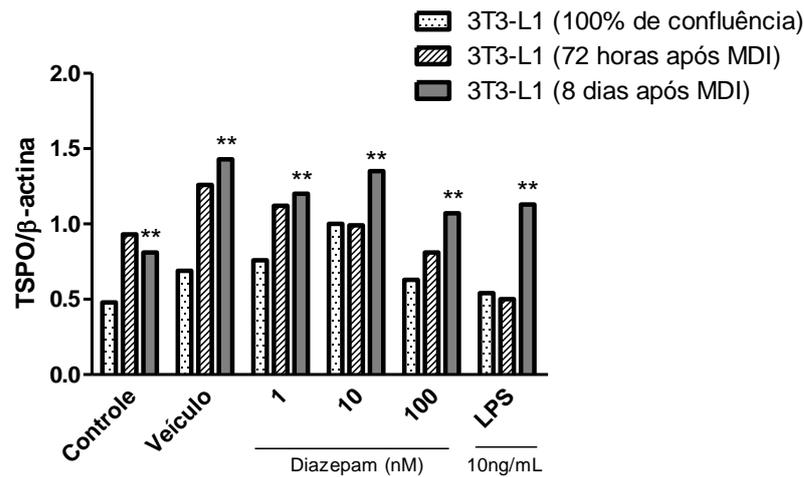
Legenda: expressão gênica relativa de (A) TSPO e (B) PPAR- γ durante a diferenciação de adipócitos da linhagem 3T3-L1 tratados com Diazepam (1, 10 e 100nM), veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10ng/mL). Como controle foi utilizado o gene endógeno 18S. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs respectivo meio.

Fonte: autoria própria.

4.5.4. Expressão protéica de TSPO

A expressão protéica de TSPO foi quantificada durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros. Os resultados obtidos mostraram que o veículo, bem como as diferentes concentrações de diazepam ou LPS modularam positivamente a expressão protéica de TSPO no 8º dia de diferenciação após a incubação pelo MDI (figura 22).

Figura 22 – Expressão protéica de TSPO por *Western blotting*



Legenda: expressão protéica de TSPO durante a diferenciação de adipócitos da linhagem 3T3-L1 tratados com Diazepam (1, 10 e 100nM), veículo (DMF 0,01%) ou LPS (10ng/mL). Como controle foi utilizado a expressão protéica de β-actina. Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM) de um ensaio de diferenciação em duplicata. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs respectivo meio.

Fonte: autoria própria.

4.6. SEÇÃO 06: novo protocolo e concentrações de diazepam para o tratamento de pré-adipócitos e adipócitos da linhagem 3T3-L1

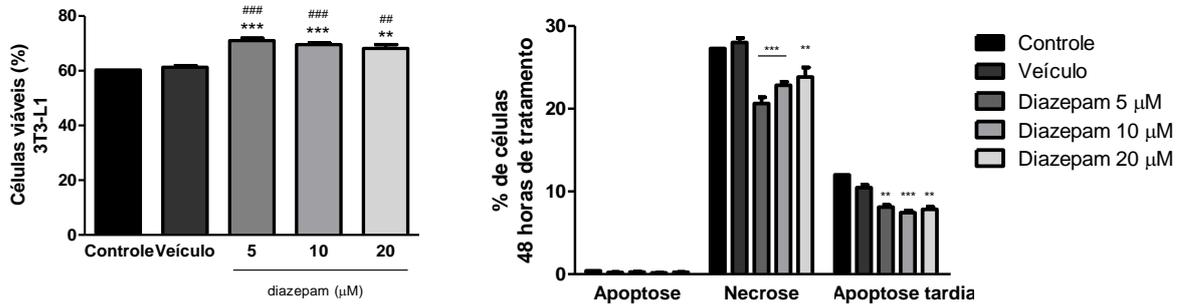
4.6.1. Ensaio para quantificação da viabilidade celular em pré-adipócitos

Para quantificar a viabilidade de pré-adipócitos tratados com diazepam (5, 10 ou 20 μM), clonazepam (1, 10 ou 50 μM) ou veículo (DMSO 0,04%), por 48 horas, e a viabilidade das células expostas ao TNF (5 ou 10 ng/mL), por 1 ou 48 horas, realizamos ensaios de viabilidade celular (Anexina V e PI) por citometria de fluxo. Os

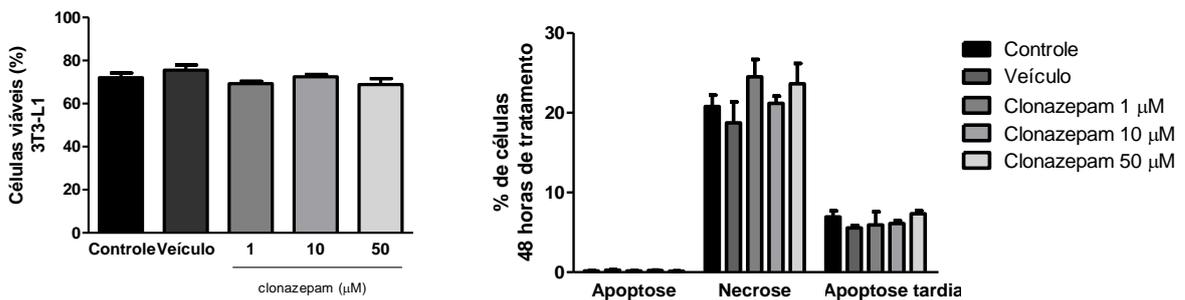
resultados obtidos mostraram que os tratamentos com diazepam, em todas as concentrações empregadas, aumentaram a porcentagem de células viáveis, por reduzirem as porcentagens de células em apoptose e necrose (figura 23A). Diferentemente, os tratamentos com clonazepam e TNF- α não modificaram a porcentagem de células mortas e mantiveram a viabilidade dos pré-adipócitos em torno de 70% (figuras 23B-D).

Figura 23 – Viabilidade celular de pré-adipócitos 3T3-L1 por citometria de fluxo

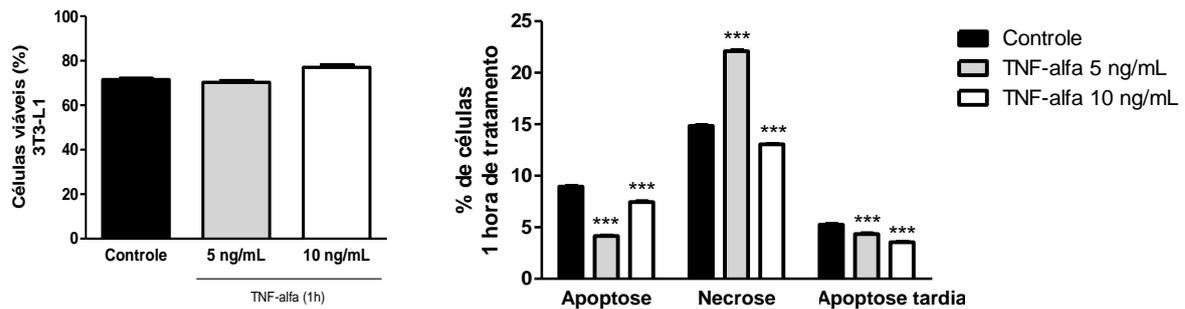
[A]



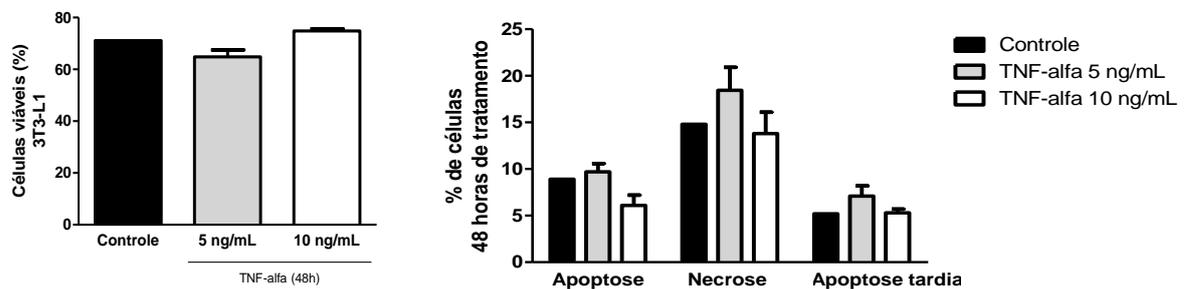
[B]



[C]



[D]

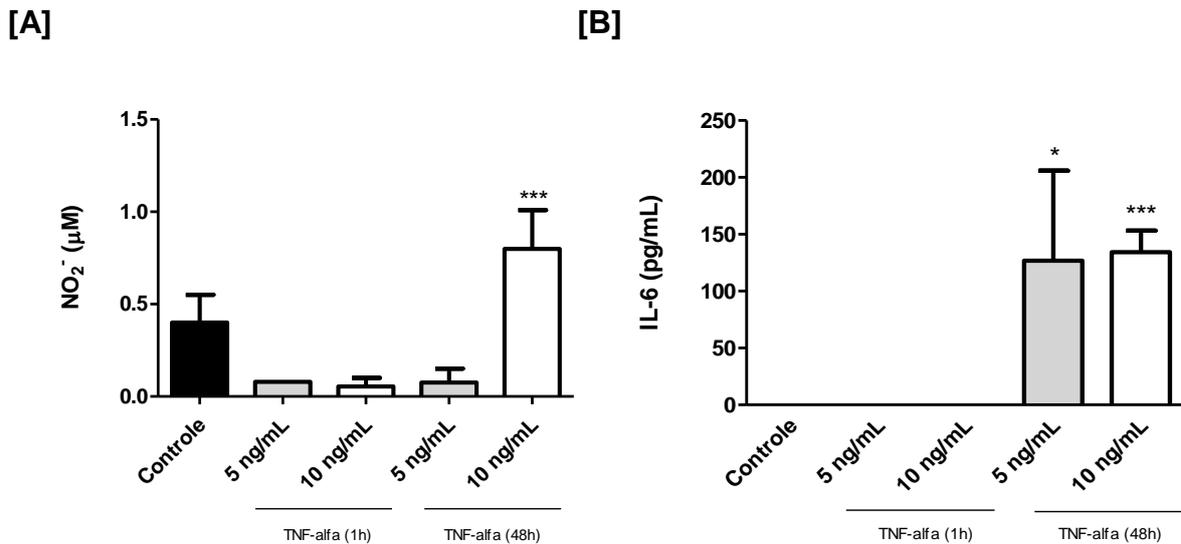


Legenda: porcentagem de pré-adipócitos viáveis e mortos por apoptose, necrose ou apoptose tardia. (A) Células tratadas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M) ou veículo (DMSO 0,04%) por 48 horas. (B) Células tratadas com clonazepam (1, 10 ou 50 μ M) ou veículo (DMSO 0,04%) por 48 horas. (C) Células estimuladas com TNF- α (5 ou 10 ng/mL) por 1 hora. (D) Células estimuladas com TNF (5 ou 10 ng/mL) por 48 horas. Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *** p < 0,001 e ** p < 0,01 vs respectivo controle (meio de cultura); ### p < 0,001 e # p < 0,01 vs respectivo veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.6.2. Ensaio para quantificação de nitritos e IL-6 nos sobrenadantes de pré-adipócitos 3T3-L1 estimulados pelo TNF- α

Para padronizar o melhor tempo e concentração de TNF- α , quantificamos a produção de NO e IL-6 nos sobrenadantes de pré-adipócitos estimulados pelo TNF- α (5 ou 10 ng/mL), por 1 ou 48 horas, pela reação de Griess e pelo método de ELISA, respectivamente. Nossos resultados mostraram que a estimulação com 10 ng/mL de TNF- α , por 48 horas, aumentou significativamente a produção de NO (figura 24A) e IL-6 (figura 24B).

Figura 24 – Produção de NO e IL-6 por pré-adipócitos 3T3-L1

Legenda: (A) quantificação de NO e (B) IL-6 nos sobrenadantes de pré-adipócitos estimulados pelo TNF- α (5 ou 10 ng/mL) por 1 ou 48 horas. Os dados representam média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs controle (meio de cultura).

Fonte: Autoria própria.

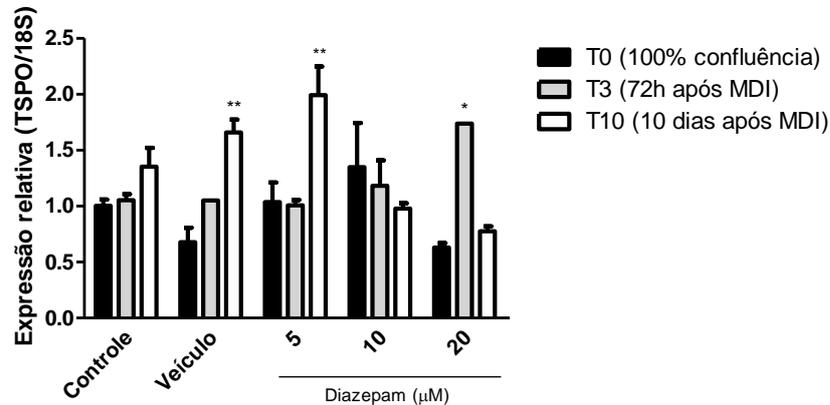
4.7. SEÇÃO 07: efeitos dos tratamentos com diazepam e/ou TNF- α sobre o processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros

4.7.1. Expressão gênica de TSPO durante a diferenciação celular: ensaio de RT-PCR em tempo real

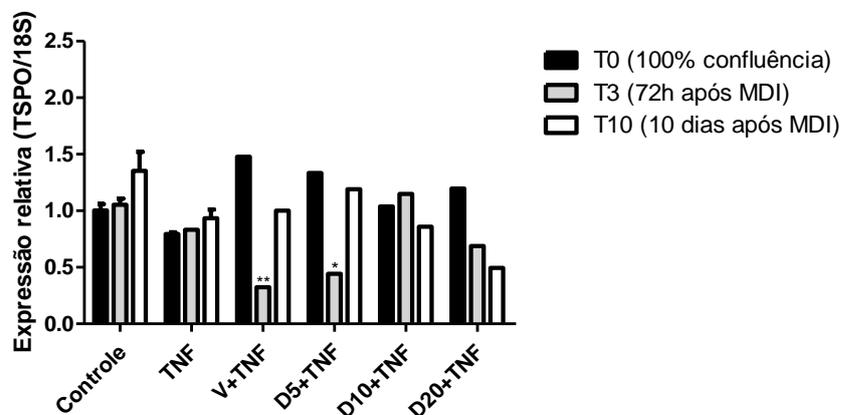
Quantificamos a expressão gênica de TSPO por RT-PCR em tempo real durante a diferenciação de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 em adipócitos maduros. Para tanto, as células foram tratadas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL), após a confluência dos pré-adipócitos, antes do início da diferenciação (figura 25A). Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento com veículo ou diazepam (5 μ M) modularam positivamente a expressão gênica de TSPO no 10^o dia de diferenciação, enquanto que o tratamento com 20 μ M de diazepam aumentou a expressão gênica de TSPO no 3^o dia de diferenciação (figura 25A). Nas células estimuladas pelo TNF- α , o tratamento com veículo ou diazepam (5 μ M) reduziram a expressão gênica de TSPO no 3^o dia de diferenciação (figura 25B).

Figura 25 – Expressão gênica de TSPO durante a diferenciação celular.

[A]



[B]



Legenda: expressão gênica relativa de TSPO durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros. Os pré-adipócitos confluentes foram tratados por 48 horas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL). Como controle utilizamos o gene endógeno 18S. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de três ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs respectivo controle (T0 100% confluência).

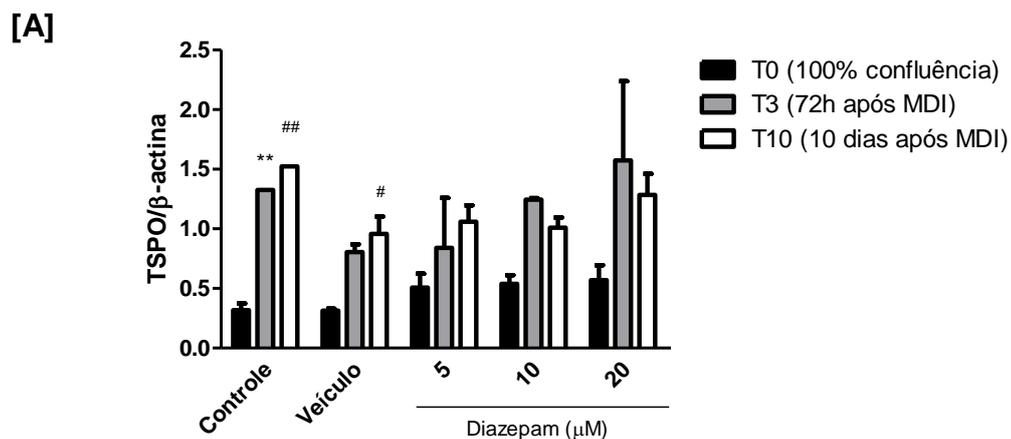
Fonte: autoria própria.

4.7.2. Expressão protéica de TSPO e PPAR- γ durante a diferenciação celular: ensaio de Western blotting

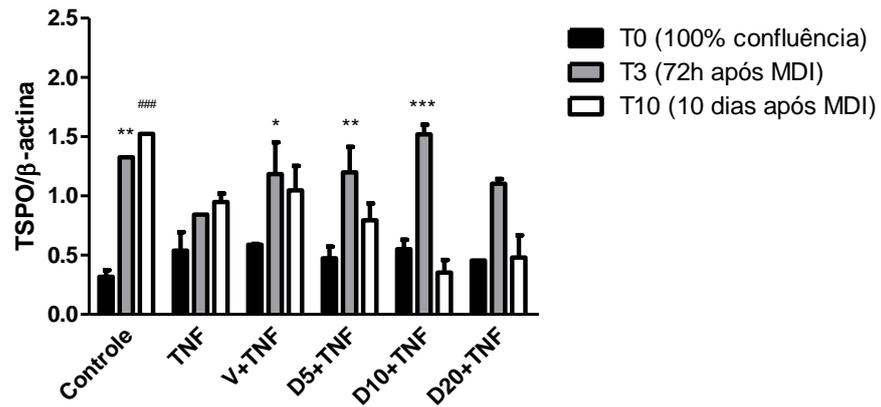
Quantificamos a expressão protéica de TSPO e PPAR- γ por *Western blotting* durante a diferenciação de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 em adipócitos maduros. Para tanto, as células foram tratadas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), veículo (DMSO

0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL), após a confluência dos pré-adipócitos, antes do início da diferenciação (figura 26A). Os resultados obtidos mostraram que a expressão de TSPO foi progressivamente modulada no grupo controle durante a diferenciação celular (figura 26A). Entretanto, o tratamento com veículo, comparado ao grupo controle, diminuiu a expressão protéica de TSPO durante o 3^o e o 10^o dia de diferenciação, e o tratamento com diazepam (5, 10 ou 20 μ M) não alterou a expressão nos mesmos tempos (figura 26A). Nas células estimuladas pelo TNF- α , o tratamento com veículo ou diazepam (5 ou 10 μ M) reverteram a diminuição da expressão protéica de TSPO induzida pelo TNF- α (figura 26B). Ademais, nossos resultados mostraram que os tratamentos com veículo ou diazepam (5, 10 ou 20 μ M) não foram capazes de reverter a diminuição da expressão protéica de PPAR- γ induzida pelo TNF- α durante o 3^o dia de diferenciação (figuras 26C e D).

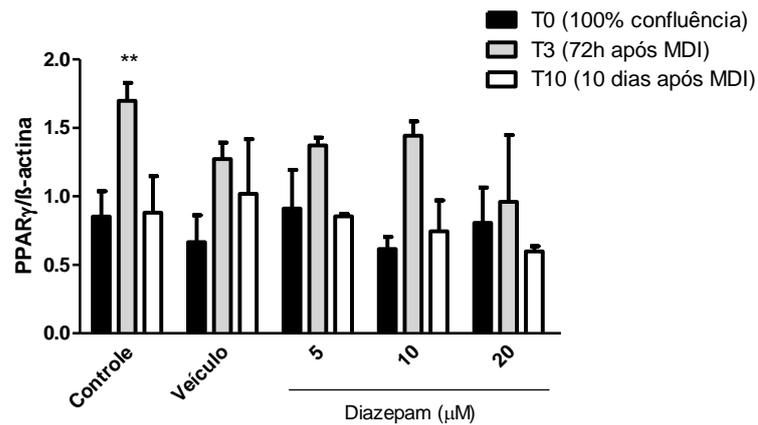
Figura 26 – Expressão protéica de TSPO e PPAR- γ durante a diferenciação celular



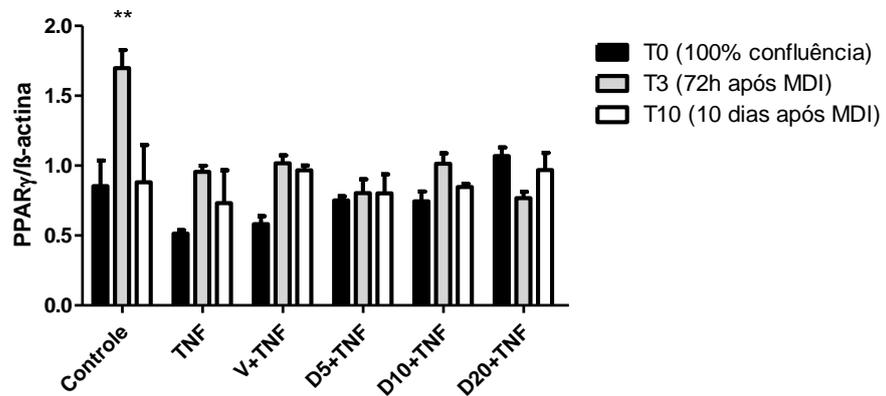
[B]



[C]



[D]



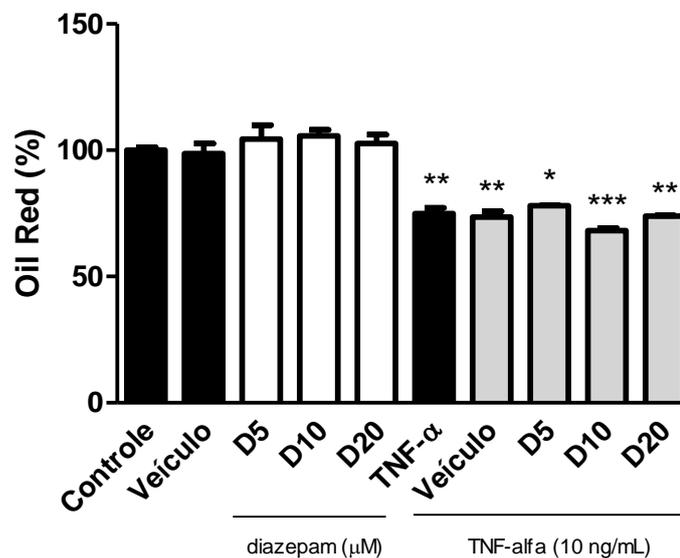
Legenda: expressão protéica de TSPO e PPAR γ durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros. Os pré-adipócitos confluentes foram tratados por 48 horas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL). Como controle utilizamos a proteína β -actina. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de três ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs respectivo T0 (100% confluência). # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs respectivo T3 (72h após MDI).

Fonte: autoria própria.

4.7.3. Quantificação do acúmulo de triacilglicerol

Para quantificar o acúmulo de triacilglicerol em adipócitos maduros tratados com diazepam (5, 10 ou 20 μM) ou veículo (DMSO 0,04%), estimulados pelo TNF- α (10 ng/mL), ou simultaneamente tratados com diazepam e TNF- α , após a confluência dos pré-adipócitos, antes do início da diferenciação, empregamos a técnica de coloração por *Oil Red O*. Os resultados obtidos mostraram diminuição da concentração de triacilglicerol nos adipócitos maduros que foram estimulados pelo TNF- α , e que o tratamento simultâneo com diazepam (5 μM) atenuou os efeitos provocados pelo TNF- α (figura 27).

Figura 27 – Acúmulo intracelular de triacilglicerol



Legenda: porcentagem de lipídeos corados pelo corante *Oil Red O*. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs controle (meio de cultura).

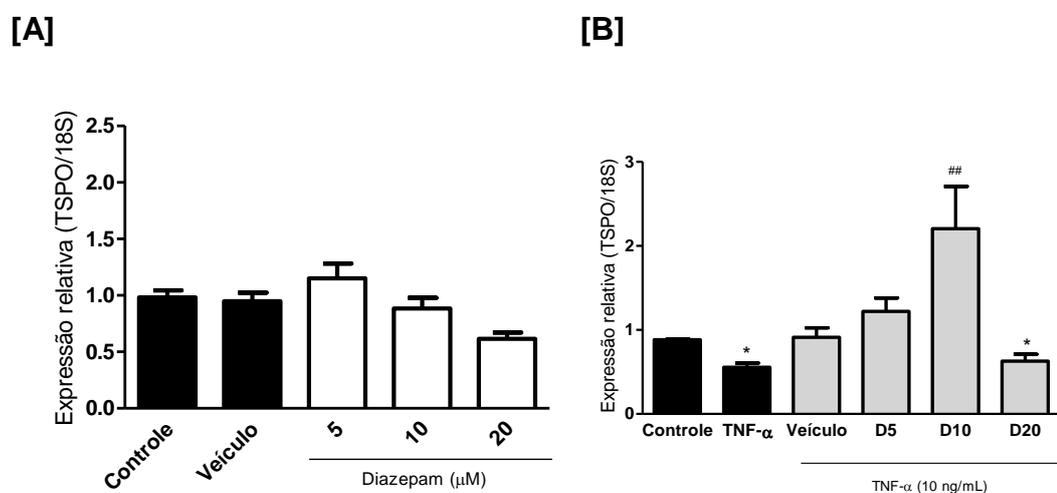
Fonte: autoria própria.

4.8. SEÇÃO 08: efeitos dos tratamentos com diazepam e/ou TNF- α em adipócitos maduros

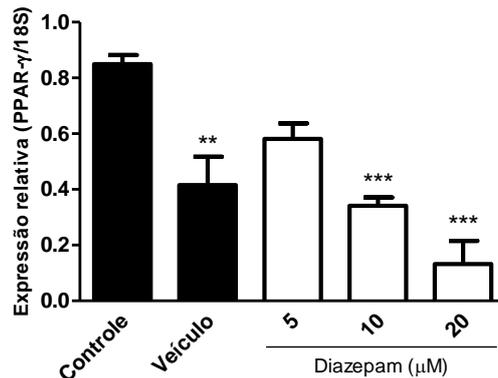
4.8.1 Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos maduros: ensaio de RT-PCR em tempo real

Quantificamos a expressão gênica de TSPO e PPAR- γ por RT-PCR em tempo real em adipócitos maduros tratados com diazepam (5, 10 ou 20 μ M) ou veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL), por 48 horas, no 10^o dia de diferenciação (figura 2B). Nossos resultados mostraram que a estimulação das células com TNF- α diminuiu a expressão gênica de TSPO (figura 28B), enquanto que o tratamento com 10 μ M de diazepam reverteu a diminuição da expressão gênica de TSPO induzida pelo TNF- α (figura 28B). Ademais, o tratamento das células com veículo ou 20 μ M de diazepam, bem como a estimulação dos adipócitos pelo TNF- α , reduziram drasticamente a expressão gênica de PPAR- γ (figuras 28C e D), e o tratamento com 10 μ M de diazepam reverteu a diminuição da expressão gênica de PPAR- γ induzida pelo TNF- α (figura 28D).

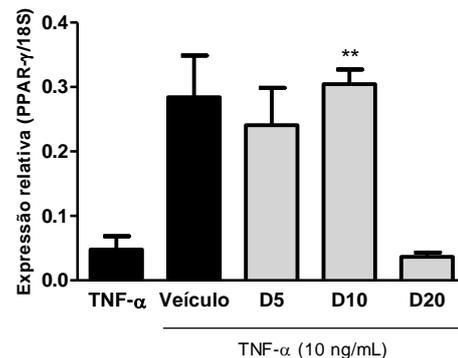
Figura 28 – Expressão gênica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos maduros.



[C]



[D]



Legenda: expressão gênica relativa de TSPO e PPAR-γ em adipócitos 3T3-L1 maduros. As células, no 10º dia de diferenciação, foram tratadas, por 48 horas, com diazepam (5, 10 ou 20 μM), veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF-α (10 ng/mL). Como controle utilizamos o gene endógeno 18S. Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três ensaios de diferenciação em triplicata. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 vs controle.

Fonte: autoria própria.

4.8.2 Expressão protéica de TSPO e PPAR-γ em adipócitos maduros: ensaio de Western blotting

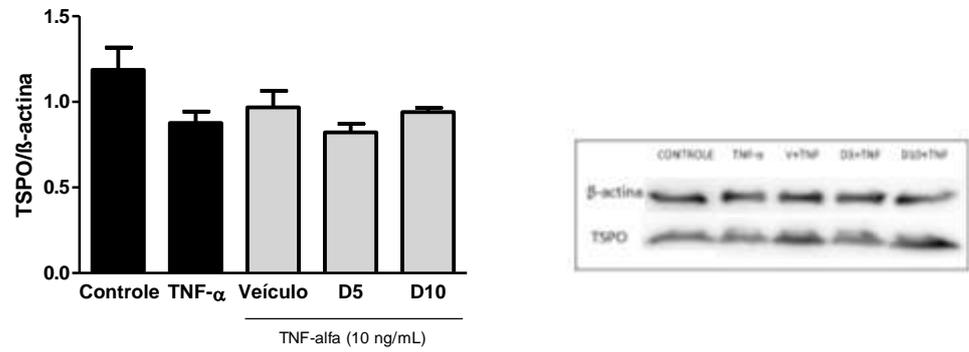
Quantificamos a expressão protéica de TSPO e PPAR-γ por *Western blotting* em adipócitos maduros tratados com diazepam (5 ou 10 μM) ou veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF-α (10 ng/mL), por 48 horas, no 10º dia de diferenciação (figura 2B). Nossos resultados mostraram que o tratamento dos adipócitos com 5 ou 10 μM de diazepam, além de modular positivamente a expressão protéica de TSPO (figura 29A), reverteram a diminuição da expressão protéica de PPAR-γ induzida pelo TNF-α (figura 29D).

Figura 29 – Expressão protéica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos 3T3-L1 maduros.

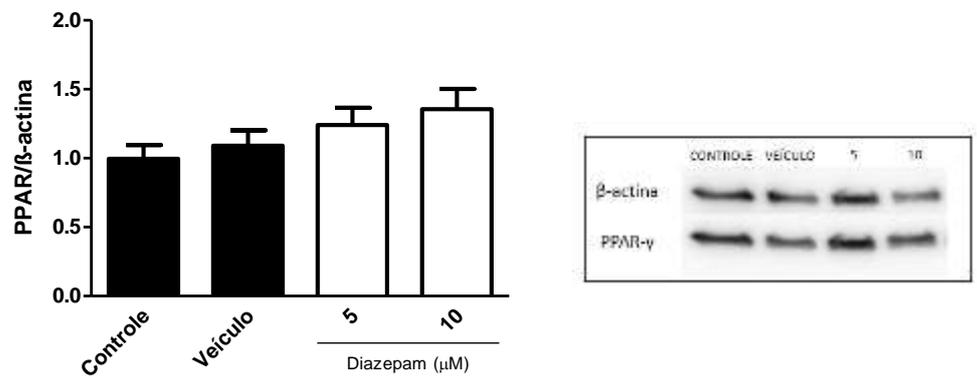
[A]



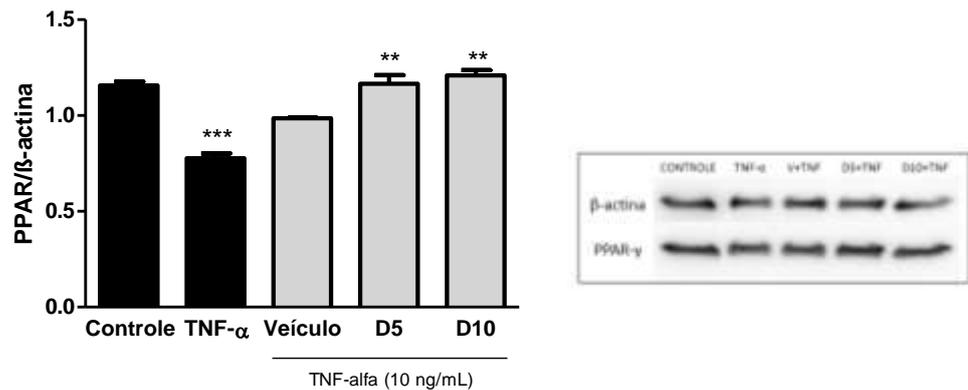
[B]



[C]



[D]



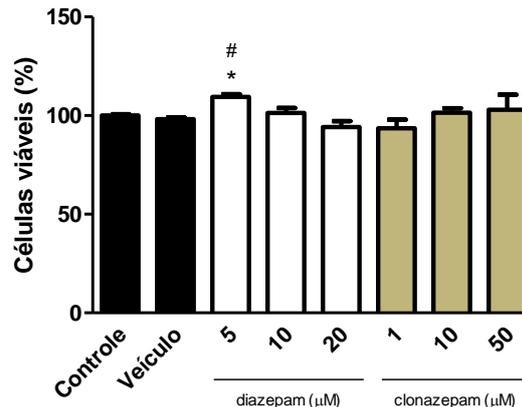
Legenda: expressão protéica de TSPO e PPAR- γ em adipócitos 3T3-L1 maduros. As células, no 10^o dia de diferenciação, foram tratadas, por 48 horas, com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), veículo (DMSO 0,04%) e/ou TNF- α (10 ng/mL). Como controle utilizamos a proteína β -actina. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de três ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controle.

Fonte: autoria própria.

4.8.3. Quantificação da atividade mitocondrial de adipócitos maduros por MTT

A viabilidade de adipócitos maduros foi determinada indiretamente por meio da mensuração da atividade das redutases mitocondriais pela técnica de redução por MTT. Para tanto, as células 3T3-L1 foram diferenciadas e, em seguida, tratadas com diazepam (5, 10 ou 20 μ M), clonazepam (1, 10 ou 50 μ M) ou veículo (DMSO 0,04%), por 48 horas, após o 10^o dia de diferenciação (figura 2B). Nossos resultados não evidenciaram diminuição da atividade das redutases mitocondriais. No entanto, interessante, a concentração de 5 μ M de diazepam, comparado ao grupo controle (100%), modulou positivamente a atividade enzimática das mitocôndrias nos adipócitos (109,48%; figura 30).

Figura 30 – Atividade enzimática mitocondrial de adipócitos 3T3-L1 maduros.



Legenda: a técnica de redução por MTT consiste na mensuração da atividade de enzimas redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas ou viáveis. Como controle positivo foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs veículo.

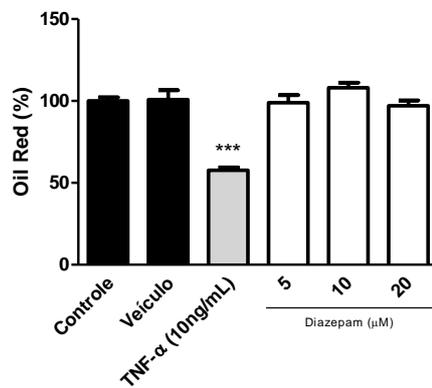
Fonte: autoria própria.

4.8.4. Quantificação do acúmulo de triacilglicerol e do glicerol livre

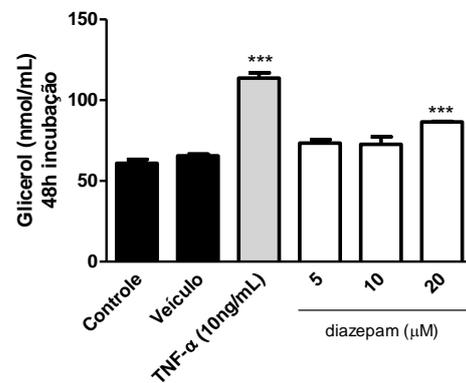
Para quantificar o acúmulo intracelular de triacilglicerol e o glicerol livre nos sobrenadantes de adipócitos maduros tratados com diazepam (5, 10 ou 20 μM), clonazepam (1, 10 ou 50 μM) ou veículo (DMSO 0,04%), estimulados pelo TNF- α (10 ng/mL), ou simultaneamente tratados com diazepam e TNF- α , no 10^o dia de diferenciação (figura 1B), empregamos a técnica de coloração por *Oil Red O* e o kit comercial para detecção de lipólise por espectrofotometria, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram: i) diminuição da concentração de triacilglicerol (figura 31A), bem como aumento do glicerol livre (figura 31B), em adipócitos maduros estimulados pelo TNF- α ; ii) aumento do glicerol livre no sobrenadante de adipócitos tratados pelo diazepam (20 μM ; figura 30B); iii) que o tratamento simultâneo com diazepam (5 μM) atenuou os efeitos provocados pelo TNF- α (figura 31C) e, iv) que o clonazepam não alterou o acúmulo de triacilglicerol (figura 31D), bem como a concentração de glicerol livre (figura 31E), nas células diferenciadas.

Figura 31 – Acúmulo intracelular de triacilglicerol e glicerol livre

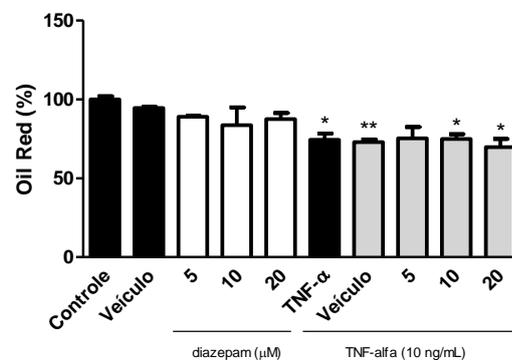
[A]



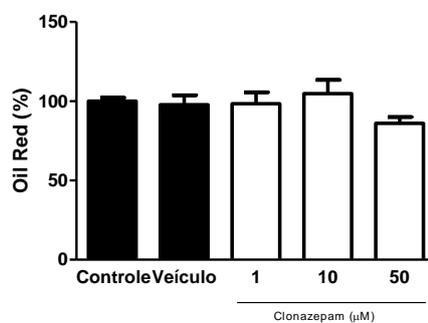
[B]



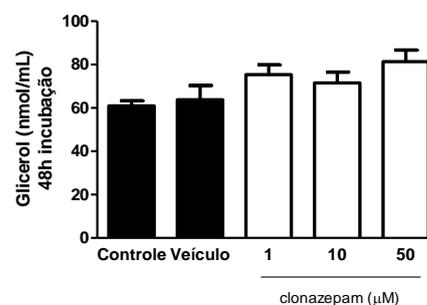
[C]



[D]



[E]



Legenda: (A-C-D) porcentagem de lipídeos corados pelo corante *Oil Red O*. (B-E) Determinação do glicerol livre (nmol/mL) em sobrenadantes de adipócitos maduros tratados pelo diazepam (B; 5, 10 ou 20 μM) ou clonazepam (E; 1, 10 ou 50 μM). Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM) de dois ensaios de diferenciação em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle (meio de cultura).

Fonte: autoria própria.

5. DISCUSSÃO

Em resumo, os resultados que foram apresentados em nosso estudo demonstram que o tratamento de pré-adipócitos com diazepam não modula a adipogênese. Ademais, apesar de o diazepam não modular a expressão gênica e protéica de PPAR- γ ; em células que foram estimuladas pelo TNF- α , o tratamento com diazepam foi capaz de reverter a diminuição da expressão gênica e protéica de PPAR- γ induzida pelo TNF- α . Este dado, que é novo, confirma nossa hipótese, demonstrando uma possível relação entre as vias que controlam a sinalização de TSPO e PPAR- γ . Ademais, além de o tratamento dos adipócitos com diazepam modular positivamente a expressão protéica de TSPO, efeito este (expressão protéica) que não observamos em células tratadas pelo clonazepam, um benzodiazepínico de ação exclusivamente central; a incubação de macrófagos com diazepam foi capaz de estimular a fagocitose *in vitro* e suprimir a produção de NO em células que foram simultaneamente estimuladas pelo LPS.

A expressão gênica de TSPO em células da linhagem 3T3-L1 foi evidenciado pela primeira vez por Wade e colaboradores (2005), que demonstraram uma regulação positiva de fitas complementares de mRNA de TSPO 18kDa durante a adipogênese. Neste sentido, com o objetivo de validar nossos *primers* e células, realizamos a expressão gênica quantitativa de TSPO nas linhagens Raw 264.7 e 3T3-L1. Os resultados obtidos corroboraram os dados de Wade e colaboradores (2005), demonstrando uma baixa expressão de TSPO nos pré-adipócitos, seguido por um aumento importante na expressão gênica deste receptor durante as fases de diferenciação celular. Assim, nos foi permitido inferir que, apesar de não terem sido estimuladas com ligantes de TSPO, a expressão gênica de TSPO foi significativamente modulada durante as fases de diferenciação das células 3T3-L1. Nossos resultados também caracterizaram a expressão gênica basal de TSPO na linhagem de macrófagos murino Raw 264.7, corroborando dados da literatura que demonstraram a expressão de TSPO em células mononucleares, tais como em monócitos e macrófagos (CANAT et al., 1993; PAPADOPOULOS et al., 2006; ZHENG et al., 2011; LAZZARINI et al., 2010; BAE et al., 2014).

A proposta de nosso estudo foi pioneira e, portanto, enfrentamos o desafio de padronizar modelos de tratamento, tempos e concentrações sem grandes referências

científicas. Deste modo, tomamos como base os estudos de nosso laboratório que utilizavam neutrófilos, mas a resposta às concentrações de ligantes de TSPO, bem como ao veículo empregado, foi bem diferente do que esperávamos. Assim, para a realização dos ensaios iniciais, o diazepam foi empregado nas concentrações de 1, 10, 100 ou 1000 nM por 24 horas, enquanto que como veículo para o diazepam utilizamos inicialmente o solvente DMF (*N,N-dimethylformamide*) a 0,01%.

O objetivo inicial deste estudo foi caracterizar a expressão e função do TSPO na diferenciação de células 3T3-L1, em macrófagos da linhagem Raw 264.7, e posteriormente desenvolver um modelo de co-cultura entre as células supracitadas para investigar os efeitos do diazepam sobre as células que foram simultaneamente estimuladas pelo LPS. No entanto, visto o tempo que levamos e os problemas que enfrentamos para padronizar o uso e os efeitos do LPS e diazepam sobre os pré-adipócitos, células da linhagem Raw 264.7, macrófagos primários e na diferenciação das células 3T3-L1, passamos a desconsiderar o objetivo inicial de desenvolver a co-cultura, e empregamos, no lugar da estimulação dos macrófagos pelo LPS, a estimulação das células 3T3-L1 por uma das principais adipocinas secretadas durante a inflamação crônica de baixa intensidade evidenciada na obesidade, o TNF- α .

Além disso, como pode ser observado em nossos resultados iniciais, muitos de nossos dados foram influenciados negativamente pelo veículo DMF a 0,01%. O solvente N-N dimetilformamida (DMF) é amplamente empregado para a solubilização de amostras contendo compostos orgânicos hidrofóbicos, e tem sido bem documentado que, ao reagir com átomos e moléculas, é capaz de formar ligações químicas (C-O, H-O, S=O) e, ainda, diferentes grupos funcionais (hidroxil, éster, aminas, sulfinil, grupos éter cíclicos), capazes de sequestrar e/ou bloquear a produção de radicais hidroxila e outras espécies reativas de oxigênio (LI, 2013). As ERO são importantes para a comunicação celular e a homeostase tecidual, e regulam diversos processos fisiológicos, tais como proliferação, resposta a hipóxia, inflamação e a resposta imune de células de mamíferos (GÖRLACH et al., 2015). Neste sentido, tem sido bem descrito pela literatura científica a participação de radicais hidroxila (\cdot HO) como precursores de produtos capazes de modular a abertura de canais mitocondriais de K⁺ sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}) via proteína quinase C *épsilon* 1 (PKC ϵ 1), elevando a produção de ERO no citosol e determinando a abertura persistente destes canais mitocondriais. Assim, o DMF parece interferir com a abertura persistente destes

canais de K⁺ sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}) via PKC ϵ 1, o que resulta em menor produção de ERO e sua sinalização (GARLID et al., 2013). Diante das evidências que foram constatadas na literatura científica, podemos inferir que o DMF é capaz de atuar paralelamente as vias que podem controlar a sinalização e os efeitos do TSPO: i) interferindo com a função das mitocôndrias e com a produção de ERO e, ii) com a ativação da via da proteína quinase C *épsilon* 1 (PKC ϵ 1), que compreende uma das isoformas de PKC ϵ que pode estar envolvida com a regulação da expressão gênica de TSPO (BATARSEH et al., 2010; GATLIFF & CAMPANELLA, 2012).

Deste modo, de 2013 até os dias atuais, vimos nossa hipótese inicial, de que o TSPO seria importante para a adipogênese, bem como para o estudo da obesidade e inflamação, apontar das mais variadas formas em vários estudos de grande relevância. Em um destes trabalhos, que utilizava o mesmo modelo celular (3T3-L1), mas diferentes ligantes de TSPO, percebemos o emprego de concentrações de ligantes de TSPO mais elevadas e respostas celulares mais acentuadas. Assim, diante dos problemas que estávamos enfrentando, passamos a considerar estas informações para a continuidade dos ensaios. Assim, com base no estudo de Li e colaboradores (2015), substituímos o veículo DMF (0,01%) pelo DMSO (0,04%), passamos a empregar concentrações mais elevadas de diazepam (5, 10 ou 20 μ M) e, adicionalmente, empregamos o clonazepam (1, 10 ou 50 μ M), um benzodiazepínico de ação exclusivamente central (GABA_A), como controle do diazepam.

Visto que na literatura não encontramos dados referentes ao uso do diazepam em células da linhagem 3T3-L1, realizamos ensaios de viabilidade celular para excluir possíveis efeitos citotóxicos e validar as novas concentrações de diazepam, clonazepam e/ou veículo. Interessantemente, os tratamentos com diazepam, em todas as concentrações empregadas, aumentaram a porcentagem de células viáveis, por reduzirem a porcentagem de pré-adipócitos mortos por apoptose, necrose e/ou apoptose tardia. Vale ressaltar que este efeito não foi observado nos tratamentos com veículo ou clonazepam (controle do diazepam), que mantiveram a viabilidade das células satisfatoriamente em torno de 70%. Assim, com base nos resultados que obtivemos, nos é permitido inferir que a ativação da proteína TSPO pelo seu ligante diazepam foi capaz de modular positivamente as vias que controlam a apoptose e a necrose celular, fato que aumentou a porcentagem de células viáveis e, possivelmente, favoreceu a proliferação e/ou a diferenciação das células.

Adicionalmente, demonstramos que o TNF- α , em ambas as concentrações que foram empregadas para padronização (5 ou 10 ng/mL), não foi citotóxico, e aumentou os níveis de NO e IL-6 nos sobrenadantes das células (10 ng/mL; 48 horas). Deste modo, com a concentração de trabalho e tempo de exposição validadas, partimos investigar os efeitos do TNF- α sobre a diferenciação das células 3T3-L1 e sobre a cultura de adipócitos maduros. Entretanto, utilizando, simultaneamente, os tratamentos com o ligante de TSPO diazepam.

Nossos resultados corroboraram os dados da literatura, mostrando que durante a adipogênese, o acúmulo de triacilglicerol pelas células em diferenciação foi consideravelmente prejudicado pelo tratamento com TNF- α . Ao mesmo tempo, o tratamento de adipócitos maduros com TNF- α aumentou a concentração de glicerol livre nos sobrenadantes, e diminuiu significativamente o acúmulo intracelular de triacilglicerol e a expressão protéica de PPAR- γ . Em conjunto, estes dados validaram nosso modelo experimental, evidenciando os efeitos do TNF- α já bem descritos pela literatura científica.

Ademais, mostramos aqui, pela primeira vez, que o tratamento com TNF- α impediu a expressão gênica progressiva de TSPO durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e, ainda, que, em adipócitos maduros, o tratamento com TNF- α diminuiu a expressão gênica e protéica de TSPO. Deste modo, ao inferirmos sobre a importância da expressão de genes adipogênicos para a biogênese mitocondrial, percebemos que, a biogênese mitocondrial, se diminuída pela ação do tratamento com TNF- α , pode responder, pelo menos em parte, pela diminuição da expressão gênica e protéica de TSPO, bem como pela diminuição do acúmulo de triacilglicerol.

Com base no que observamos, partimos investigar se o diazepam poderia modular os efeitos provocados pelo tratamento com TNF- α . Assim, primeiramente, observamos que o aumento da expressão gênica e protéica de TSPO, provocados pelos tratamentos com diazepam durante a diferenciação das células 3T3-L1 ou em adipócitos maduros, não foi acompanhado pelo acúmulo de triacilglicerol, mas pela expressão protéica de PPAR- γ em adipócitos maduros. Ainda não nos é possível inferir sobre os mecanismos que medeiam esta importante indução protéica de PPAR- γ via ativação de TSPO por seu ligante diazepam (5 ou 10 μ M). No entanto, adipocinas, espécies reativas de oxigênio e NO poderiam atuar como moléculas sinalizadoras (ZHANG et al., 2013). Com estes dados, inferimos que a expressão

gênica e protéica de TSPO, em condições basais, seja parte integrante do processo de biogênese mitocondrial, e que a ativação de TSPO pelo seu ligante diazepam não modula o processo de adipogênese. Assim, uma vez que não encontramos alterações na adipogênese induzidas pelo tratamento dos pré-adipócitos com diazepam (5, 10 ou 20 μM), não seguimos adiante com os ensaios para a quantificação dos genes: C/EBP- α , FABP4.

As mitocôndrias, além de estar envolvidas no catabolismo de aminoácidos, ciclo da uréia e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), estão associadas à regulação de várias vias de sinalização, tais como as vias que controlam a apoptose e a morte celular (BOUDINA & GRAHAM, 2014). Deste modo, com base nos resultados que obtivemos, evidenciamos que a incubação dos adipócitos maduros com diazepam, clonazepam ou veículo não diminuíram a viabilidade das células por MTT, mas a ativação da proteína TSPO pelo seu ligante diazepam (5 μM) foi capaz de modular positivamente a atividade mitocondrial dos adipócitos. Interessantemente, demonstramos que a ativação da proteína TSPO pelo seu ligante diazepam (5 μM) atenuou a lipólise provocada pela ação do TNF- α em adipócitos maduros.

Interessantemente, o tratamento simultâneo empregando diazepam (5 μM) e TNF- α também atenuou a diminuição do acúmulo de triacilglicerol provocada pela ação do TNF- α sobre a diferenciação das células 3T3-L1 em adipócitos maduros. Este efeito antagonista do diazepam foi acompanhado por um aumento na expressão gênica de TSPO (5 ou 10 μM) em adipócitos maduros, e nos demonstrou que a ativação do TSPO pelo seu ligante diazepam (5 μM) foi capaz de, pelo menos em parte, modular a adipogênese, favorecendo a expressão protéica de PPAR- γ , o acúmulo de triacilglicerol e, possivelmente, recuperando a atividade mitocondrial das células.

Sabemos da importância que é a produção de espécies reativas de oxigênio para a homeostase e comunicação celular, e que o TSPO, além de estar associado com a produção de ERO (MAULIK & KUMAR, 2012), possui inúmeras outras funções mitocondriais (GATLIFF & CAMPANELLA, 2012). Como exemplo, podemos citar a produção de NO que é dependente da atividade de um grupo de enzimas denominado NO *synthases* (NOS). Diferentes isoformas são expressas constitutivamente no cérebro (nNOS) e no endotélio (eNOS), enquanto que também podem ser significativamente induzidas em outros tecidos e células da imunidade (iNOS)

(AKTAN, 2004). Assim, apesar das particularidades de cada isoforma, ambas necessitam do cofator heme para a ativação de seu sítio catalítico (KNOWLES & MONCADA, 1994; AKTAN, 2004). Ademais, a produção do cofator heme é mitocondrial e diretamente dependente da protoporfirina IX (VÁGÁNI & SMITH, 2015). Interessantemente, inúmeros trabalhos na literatura demonstram a participação do TSPO na biossíntese do cofator heme e, ainda, a protoporfirina IX como um ligante endógeno de TSPO (VEENMAN et al., 2007).

Deste modo, durante a inflamação crônica de baixa intensidade, altos níveis de adipocinas inflamatórias, bem como de NO (iNOS), poderiam contribuir para a sustentação dos efeitos inflamatórios, o que favoreceria o mal funcionamento das células (POULAIN-GODEFROY; FROGUEL, 2007). Em contrapartida, dados da literatura mostram que o NO, além de um importante mensageiro intracelular, possui papel relevante em vários sistemas biológicos, como o imune, nervoso e cardiovascular e, ainda, modula os estoques de gordura pelo aumento da captação de glicose mediada pela insulina e da diminuição da lipólise (BREDT; SNYDER, 1994; DAWSON; DAWSON, 1995; GAUDIOT et al., 2000). Neste sentido, nós mostramos que o tratamento de pré-adipócitos com TNF- α aumentou os níveis de IL-6 e NO, e que o tratamento de macrófagos primários com LPS modulou positivamente a produção de NO. Interessantemente, o tratamento simultâneo com diazepam, ainda nas concentrações antigas de diazepam (1, 10 ou 100 nM), reverteu significativamente a produção de NO (1 ou 10 nM) evocada pela incubação com LPS, e o tratamento com 100 nM de diazepam aumentou a atividade fagocítica de células Raw 264.7. Estes dados são interessantes e únicos na literatura, e demonstram a atuação do TSPO modulando vias importantes para inúmeras funções celulares.

A proteína TSPO e seus ligantes podem afetar inúmeras funções celulares dependendo do tipo celular em que está expresso e da densidade de expressão (GAVISH et al., 1992; IKEZAKI; BLACK, 1992; CANAT et al., 1993). No entanto, é importante ressaltar que sob algumas condições fisiológicas e dependendo da concentração do ligante utilizada (micro ou nanomolar), tipo de tecido ou célula, estes ligantes poderão apresentar efeitos agonistas, antagonistas ou mistos (SCARF et al., 2011; SHANY et al., 1994; CHAUVEAU et al., 2008; RUPPRECHT et al., 2010). Assim, temos observado que a concentração de 20 μ M de diazepam, diferentemente das concentrações de 5 ou 10 μ M, diminui de maneira expressiva a expressão gênica de

PPAR- γ e TSPO, tal qual o TNF- α . Interessantemente, pudemos ver também que a concentração de 20 μ M de diazepam diminuiu o acúmulo de triacilglicerol, bem como aumentou a concentração de glicerol livre no sobrenadante das células. Este efeito é muito interessante, mas os dados são isolados e a maioria dos resultados com a concentração de 20 μ M de diazepam são inconclusivos.

Ademais, nossos resultados evidenciaram que a incubação dos adipócitos maduros com clonazepam não foi capaz de aumentar a expressão protéica de TSPO. Entretanto, os resultados obtidos evidenciaram que a ativação da proteína TSPO pelo seu ligante diazepam (5 ou 10 μ M) foi capaz de modular positivamente a expressão da proteína TSPO. Ainda, nossos dados demonstraram uma diminuição da expressão gênica de TSPO e PPAR- γ e da expressão protéica de PPAR- γ em adipócitos maduros estimulados pelo TNF- α . Além disso, interessantemente, nestas células, o tratamento com diazepam (10 μ M) reverteu a diminuição da expressão gênica de TSPO e PPAR- γ provocada pela ação do TNF- α , e o tratamento com diazepam (5 ou 10 μ M) modulou positivamente a diminuição da expressão protéica de PPAR- γ induzida pelo TNF- α .

6. CONCLUSÃO

Em resumo, estes dados, que são novos, e vêm de encontro das hipóteses já descritas pela literatura científica, confirmam a possível relação entre as vias que controlam a sinalização de TSPO e PPAR- γ , e demonstram a regulação da proteína TSPO nas vias que controlam a morte celular por apoptose, a produção de NO e a fagocitose. Assim, apesar de inferirmos que, pelo menos em parte, a ativação de TSPO pelo seu ligante diazepam é capaz de modular a ativação de NF-kB induzida pelo TNF- α , revertendo a diminuição da expressão gênica de TSPO e PPAR- γ e a expressão protéica de PPAR- γ , não nos é possível inferir sobre o real mecanismo que regula este processo.

Por fim, concluímos que, apesar das dificuldades que enfrentamos, e do pioneirismo da proposta, que ora nos levou ou não distante dos caminhos mais corretos para a condução desta Tese, estamos certos de nossa contribuição para com o nosso laboratório, para com os dados e futuros projetos do laboratório e, com o amadurecimento dos novos dados, para com a literatura científica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 327-332, 2000.

AHMADIAN, M.; ABBOTT, M. J.; TANG, T.; HUDAK, C. S.; KIM, Y.; BRUSS, M.; HELLERSTEIN, M. K.; LEE, H. Y.; SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I.; WANG, Y.; DUNCAN, R. E.; KANG, C.; SUL, H. S. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. **Cell Metab**, v. 13, p. 739-748, 2011.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, v. 75, p. 639-53, 2004.

ANHOLT, R. R. H.; DE SOUZA, E. B.; OSTER-GRANITE, M. L.; SNYDER, S. H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: Autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 233, p. 517-523, 1985.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur. J. Immunol**, v. 11, p. 805-815, 1981.

BÄCKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. L. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 979-984, 2007.

BAE, K. R.; SHIM, H. J.; BALU, D.; KIM, S. R.; YU, S. W. Translocator protein 18kDa negatively regulates inflammation in microglia. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 9, p. 424-437, 2014.

BAGGIOLINI, M.; WYMANN, M. P. The respiratory burst. **TIBS**, v. 15, p. 69-72, 1990. BALAFANOVA, Z.; BOLLI, R.; ZHANG, J.; ZHENG, Y.; PASS, J. M.; BHATNAGAR, A.; TANG, X-L.; WANG, O.; CARDWELL, E.; PING, P. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase C ϵ (PKC ϵ), facilitating PKC ϵ translocation via enhanced PKC ϵ -RACK2 interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15021-15027, 2002.

BARTH, K. A.; WATERFIELD, D.; BRUNETTE, D. M. The effect of surface roughness on RAW 264.7 macrophage phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 00A, p. 1-10, 2013.

BASILE, A. S.; LUEDDENS, H. W.; SKOLNICK, P. Regulation of renal peripheral benzodiazepine receptors by anion transport inhibitors. **Life Sci**, v. 42, p. 715-726, 1988.

BASS, D. A.; PERCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BASS, D. A.; PERCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BATARSEH, A.; GIATZAKIS, C.; PAPADOPOULOS, V. Phorbol-12myristate 13-acetate acting through protein kinase C epsilon induces translocator protein (18 kDa) TSPO gene expression. **Biochemistry**, v. 47, p. 12886-12899, 2008.

BATARSEH, A.; LI, J.; PAPADOPOULOS, V. Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) Tspo gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors. **Biochemistry**, v. 49, p. 4766-78, 2010.

BENTO DE LIMA, C.; TAMURA, E. K.; MONTERO-MELENDEZ, T.; PALERMONETO, J.; PERRETI, M.; MARKUS, R. P.; FARSKY, S. H. P. Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 918-923, 2012.

BESMAN, M. J.; YANAGIBASHI, K.; LEE, T. D.; KAWAMURA, M.; HALL, P. F.; SHIVELY, J. E. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. **Proc Natl Acad Sci**, v. 86, p. 4897-4901, 1989.

BOUDINA, S.; GRAHAM, T. E. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. **Exp Physiol**, v. 99, p. 1168-1678, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAESTRUP, C.; ALBRECHTSEN, R.; SQUIRES, R. F. High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. **Nature**, v. 269, p. 702-704, 1977.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUÇA, M.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, p. 354-66, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2013: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BREDDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. **Annu. Rev. Biochem**, v. 63, p. 175-95, 1994.

CAESAR, R. REIGSTAD, C. S.; BÄCKHED, H. K.; REINHARDT, C.; KETONEN, M.; LUNDÉN, G. Ö.; CANI, P. D.; BÄCKHED, F. Gut-derived lipopolysaccharide augments

adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. **Gut**, v. 61, p. 1701-1707, 2012.

CAMPIOLI, E.; BATARSEH, A.; LI, J.; PAPADOPOULOS, V. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate effects the differentiation of human liposarcoma cells (SW 872). **PLOS one**, v. 6, p. 1-10, 2011.

CANAT, X.; CARAYON, P.; BOUABOULA, M.; CAHARD, D.; SHIRE, D.; ROQUE, C.; LE FUR, G.; CASELLAS, P. Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. **Life Sciences**, v. 52, p. 107-118, 1993.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELMÉE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIÈRES, J.; TANTI, J. F.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C.; BURCELIN, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1761-1772, 2007.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, p. 277-359, 2004.

CAO, Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 107–115, 2010.

CARLINI, E. A.; NAPPO, S. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R. Drogas psicotrópicas – o que são e como agem. **Revista IMESC**, n. 3, p. 9-35, 2001.

CASELLAS, P.; GALIEGUE, S.; BASILE, A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. **Neurochem Intern**, v. 40, p. 475-486, 2002.

CHAUVEAU, F.; BOUTIN, H.; CAMP, N. V.; DOLLÉ, F.; TAVITIAN, B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [¹¹C] PK11195 challengers. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 35, p. 2304-2319, 2008.

CHEN, M. K.; GUILARTE, T. R. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. **Pharmacol. Ther**, v. 118, p. 1–17, 2008.

CHOI, J.; IFUKU, M.; NODA, M.; GUILARTE, T. R. Translocator protein (18kDa)/peripheral benzodiazepine receptor specific ligands induce microglia functions consistent with an activated state. **GLIA**, v. 59, p. 219-230, 2011.

CHRISTIAENS, V.; LIJNEN, H. R. Angiogenesis and development of adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**, v. 318, p. 2–9, 2010.

CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; MURANO, I.; CERESI, E.; FALOIA, E.; WANG, S.; FORTIER M.; GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, p. 2347–55, 2005.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthases: the Cinderella of inflammation? **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 91-5, 2003.

CORCIA, P.; TAUBER, C.; VERCOULLIE, J.; ARLICOT, N.; PRUNIER, C.; PRALINE, J.; NICOLAS, G.; VENEL, Y.; HOMMET, C.; BAULIEU, J-L.; COTTIER, JP.; ROUSSEL, C.; KASSIOU, M.; GUILLOTEAU, D.; RIBEIRO, M-J. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-7, 2012.

COUSIN, B.; MUNOZ, O.; ANDRE, M. FONTANILLES, A. M.; DANI, C.; COUSIN, J. L.; LAHARRANGUE, P.; CASTELLA, L.; PÉNICAUD, L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 305-312, 1999.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide: Actions and pathological roles. **The Neuroscientist**, v. 1, p. 7-18, 1995.

De PAUW, A.; TEJERINA, S.; RAES, M.; KEJJER, J.; ARNOULD, T. Mitochondrial (dys)function in adipocytes (de)differentiation and systemic metabolic alterations. **Am J Pathol**, v. 175, p. 927-939, 2009.

DOORDUIN, J.; DE VRIES, E. F.; DIERCKX, R. A.; KLEIN, H. C. PET imaging of the peripheral benzodiazepine receptor: monitoring disease progression and therapy response in neurodegenerative disorders. **Curr. Pharm**, v. 14, p. 3297-3315, 2008.

DRESSEL, U.; ALLEN, T. L.; PIPPAL, J. B.; ROHDE, P. R.; LAU, P.; MUSCAT, G. E. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. **Mol Endocrinol**, v. 17, p. 2477-93, 2003.

DREYER, C.; KELLER, H.; MAHFOUDI, A.; LAUDET, V.; KREY, G.; WAHLI, W. Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). **Biol Cell**, v. 77, p. 67-76, 1993.

DUNCAN, R. E.; AHMADIAN, M.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H. S. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 79-101, 2007.

FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Transcriptional regulation of translocator protein (TSPO) via a SINE B2-mediated natural antisense transcript in MA-10 Leydig cells. **Biology of reproduction**, v. 86, p. 1-15, 2012.

FARMER, S. R. Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. S13-S16, 2004.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; de OLIVEIRA, E. M.; SANDRI, S.; KNEBEL, F. H.; ALBUQUERQUE, R. C.; CAMPA, A. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 36, p. 1032-1039, 2012.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res**, v. 43, p. 532-41, 1999.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S192-S203, 2007.

GAO, Y.; YANG, M-F.; SU, Y-P.; JIANG, H-M.; YOU, X-J.; YANG, Y. Y.; ZHANG, H.-L. Ginsenoside Re reduces insulin resistance through activation of PPAR- γ pathway and inhibition of TNF- α production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 509-516, 2013.

GARLID, A. O.; JABUREK, M.; JACOBS, J. P.; GARLID, K. D. Mitochondrial reactive oxygen species: which ROS signals cardioprotection? **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 305, p. H960-H968, 2013.

GARNIER, M.; BOUJRAD, N.; OKE, B. O.; BROWN, A. S.; RIOND, J.; FERRARA, P.; SHOYAB, M.; SUAREZQUIAN, C. A.; PAPADOPOULOS, V. Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via the peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. **Endocrinology**, v.132, p.444-458, 1993.

GATLIFF, J.; CAMPANELLA, M. The 18 kDa translocator protein (TSPO): a new perspective in mitochondrial biology. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 356-368, 2012.

GAUDIOT, N.; RIBIERE, C.; JAUBERT, A.; GIUDICELLI, Y. Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidante-related effect. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, C1603-C1610, 2000.

GAVISH, M.; BACHMAN, I.; SHOUKRUN, R.; KATZ, Y.; VEENMAN, L.; WEISINGER, G.; WEIZMAN, A. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. **Pharmacol Rev**, v. 51, p. 629–650, 1999.

GAVISH, M.; KATZ, Y.; BAR-AMI, S.; WEIZMAN, R. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. **J Neurochem**, v.58, p.1589-1601, 1992.

GAZOULI, M.; YAO, Z-X.; BOUJRAD, N.; CORTON, C.; CULTY, M.; PAPADOPOULOS, V. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor α . **Endocrinology**, v. 143, p. 2571-2583, 2002.

GHANIM, H.; SIA, C. L.; UPADHYAY, M.; KORZENIEWSKI, K.; VISWANATHAN, P.; ABUAYSHEH, S.; MOHANTY, P.; DANDONA, P. **Am J Clin Nutr**, v. 91, p. 940-9, 2010.

GIATTI, S.; PESARESI, G.; CAVALETTI, G.; BIANCHI, R.; CAROZZI, V.; LOMBARDI, R.; MASCHI, O.; LAURIA, G.; GARCIA-SEGURA, L. M.; CARUSO, D.; MELCANGI, R. C. Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18kDa (Ro5-4864) in experimental diabetic neuropathy. **Neuroscience**, v. 164, p. 520-529, 2009.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 23–35, 2003.

GÖRLACH, A.; DIMOVA, E. Y.; PETRY, A.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; HERNANDEZ-AGUSTÍN, P.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M.; KIETZMANN, T. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? **Redox Biology**, v. 6, p. 372-385, 2015.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocytes differentiation. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 783-810, 1998.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." **Chem. Ber**, v. 12, p. 426–8, 1879.

GUT, P.; BAEZA-RAJA, B.; ANDERSSON, O.; HASENKAMP, L.; HSIAO, J.; HESSELSON, D.; AKASSOGLOU, K.; VERDIN, E.; HIRSCHEY, M. D.; STAINIER, D. Y. R. Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 97-106, 2013.

HARBERTS, E.; DATTA, D.; CHEN, S.; WOHLER, J. E.; OH, U.; JACOBSON, S. Translocator protein 18kDa (TSPO) expression in multiple sclerosis patients. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, p. 51-57, 2013.

HATORI, A.; YUI, J.; YAMASAKI, T.; XIE, L.; KUMATA, K.; FUJINAGA, M.; YOSHIDA, Y.; OGAWA, M.; NENGAKI, N.; KAWAMURA, K.; FUKUMURA, T.; ZHANG, M. R. PET imaging of lung inflammation with [18F] FEDAC, a radioligand for translocator protein (18 kDa). **PLoS One**, v. 7, 2012.

HAUSMAN, G. J.; RICHARDSON, R. L. Adipose tissue angiogenesis. **J Anim Sci**, v. 82, p. 925–934, 2004.

HIRSCH, T.; DECAUDIN, D.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; LAROCLETTE, N.; RESCHE-RIGON, M.; KROEMER, G. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. **Exp Cell Res**, v. 241, p. 426–434, 1998.

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

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, p. 665–8, 1996.

HUBE, B.; BIRGEL, M.; LEE, Y. M.; HAUNER, H. Expression pattern of tumor necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Clin Invest**, v. 29, p. 672-678, 1999.

IKEZAKI, K.; BLACK, K. L. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepines. **Cancer Lett**, v. 49, p. 115-120, 1990.

JIN, D.; SUN, J.; HUANG, J.; HE, Y.; YU, A.; YU, X.; YANG, Z. TNF-alpha reduces g0s2 expression and stimulates lipolysis through PPAR-gamma inhibition in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**, v. 69, p. 196-205, 2014.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica** / L. C. Junqueira, José Carneiro. – 11.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840–846, 2006a.

KAHN, S. E.; ZINMAN, B.; HAFFNER, S. M.; O'NEILL, M. C.; KRAVITZ, B. G.; YU, D.; FREED, M. I.; HERMAN, W. H.; HOLMAN, R. R.; JONES, N. P.; LACHIN, J. M.; VIBERTI, G. C.; ADOPT, S. G. Obesity is a major determinant of the association of C-reactive protein levels and the metabolic syndrome in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, p. 2357–64, 2006b.

KARLSTETTER, M.; NOTHDURFTER, C.; ASLANIDIS, A.; MOELLER, K.; HORN, F.; SCHOLZ, R.; NEUMANN, H.; WEBER, B. H.; RUPPRECHT, R.; LANGMANN, T. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 1-12, 2014.

KELLER, H.; DREYER, C.; MEDIN, J.; MAHFOUDI, A.; OZATO, K.; WAHLI, W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 2160–4, 1993.

KELLY, C J.; COLGAN, S. P.; FRANK, D. N. Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. **Nutrition and Clinical Practice**, v. 27, p. 215-225, 2012.

KELLY, C. J.; COLGAN, S. P.; FRANK, D. N. Of Microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. **Nutr Clin Pract**, v. 27, p. 215–225, 2012.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, p. 421–4, 2000.

KIECOLT-GLASER, J. K.; PREACHER, K. J.; MACCALLUM, R. C. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 9090–9095, 2003.

KIM, C.S.; PARK, H. S.; KAWADA, T.; KIM, J. H.; LIM, D.; HUBBARD, N. E.; KWON, B. S.; ERICKSON, K. L.; YU, R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. **Int J Obes (Lond)**, v. 3, p. 1347–55, 2006.

KINANI, S.; BOUCHONNET, S.; MLAN, N.; RIDORDEL, I. A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatography A**, v. 1141, p. 131-137, 2007.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v. 298 (Pt 2), p. 249-258, 1994.

KOPECK'Y, J.; ROSSMEISL, M.; FLACHS, P.; BARDOV'A, K.; BRAUNER, P. Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes. **Biochem Soc Trans**, v. 29, p. 791-797, 2001.

KOSTELI, A.; SUGARU, E.; HAEMMERLE, G.; MARTIN, J. F.; LEI, J.; ZECHNER, R.; FERRANTE, A. W. Jr. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 120, p. 3466–3479, 2010.

KUDO, M.; SUGAWARA, A.; URUNO, A.; TAKEUCHI, K.; ITO, S. Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 145, p. 4948-56, 2004.

LACAPERE, J. J.; PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. **Steroids**, v. 68, p. 569-585, 2003.

LASSANCE, L.; HAGHIAC, M.; MINIU, J.; CATALANO, P.; MOUZON, S. H. Obesity-induced down regulation of the mitochondrial translocator protein (TSPO) impairs placental steroid production. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, p. E11-E18, 2015.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; MUSCARÁ, M. N.; De NUCCI, G.; PALERMO-NETO, J. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life Sci**, v. 71, p. 2361–2368, 2003.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; PALERMO-NETO, J.; Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, v. 23, p. 253–265, 2001.

LAZZARINI, R.; PAULINO, C. A.; MALUCELLI, B. E.; PALERMO-NETO, J. Effects of high doses of diazepam on carrageenin-induced paw edema in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 29, p. 1525–1529, 1996.

LAZZARINI, R.; SAKAI, M.; COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Diazepam decreases leukocyte-endothelium interactions in situ. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 32, p. 402-409, 2010.

LEE, D. H.; KANG, S. K.; LEE, R. H.; RYU, J. M.; PARK, H. Y.; CHOI, H. S.; BAE, Y. C.; SUH, K. T.; KIM, Y. K.; JUNG, J. S. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, p. 91-99, 2004.

LETO, T. L. The Respiratory Burst Oxidase. In: GALIN, J. I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 769-786.

LI, J.; DALY, E.; CAMPIOLI, E.; WABITSCH, M.; PAPADOPOULOS, V. *De Novo* synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 747-764, 2014.

LI, J.; PAPADOPOULOS, V. Translocator protein (18 kDa) as a pharmaceutical target in adipocytes to regulate glucose homeostasis. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, p. 99-110, 2015.

LI, X. Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2083-2088, 2013.

LIMA, CAMILA BENTO de. **Efeito dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária: participação de receptores de glicocorticóides**. 2012. 122p. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – São Paulo.

LINDEMANN, J. F. P.; FEUILLOLEY, M. G. J.; PAPADOPOULOS, V. Structural and functional evolution of the Translocator Protein (18kDa). **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 369-386, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, p. 175-184, 2007.

LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; SALTIEL, A. R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. 166-74, 2007.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 677-686, 2004.

MARINO, F.; CATTANEO, S.; COSENTINO, M.; RASINI, E.; DI GRAZIA, L.; FIETTA, A.M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Diazepam stimulates migration and phagocytosis of human neutrophils: possible contribution of peripheral-type benzodiazepine receptors and intracellular calcium. **Pharmacology**, v. 63, p. 42-49, 2001.

MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sci**, v. 65, p. 2157-2165, 1999.

MAULIK, S. K.; KUMAR, S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. **Toxicol Mech Methods**, v. 22, p. 359-66, 2012.

MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; TAN, N. S.; BASU-MODAK, S.; ESCHER, P.; RIEUSSET, J.; PETERS, J. M.; KAYA, G.; GONZALES, F. J.; ZAKANI, J.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; DUBOULE, D.; WAHLI, W. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. **J Cell Biol**, v. 154, p. 799–814, 2001.

MILLER, G.; CHEN, E.; COLE, S. W. Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. **Annu Rev Psychol**, v. 60, p. 501–524, 2009.

MITRO, N.; CERMENATI, G.; GIATTI, S.; ABBIATI, F.; PESARESI, M.; CALABRESE, D.; GARCIA-SEGURA, L. M.; CARUSO, D.; MELCANGI, R. C. LXR and TSPO as new therapeutic targets to increase the levels of neuroactive steroids in the central nervous system of diabetic animals. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 616-621, 2012.

MONTEIRO, F. B. F. **Papel da amilóide sérica A (SAA) nos processos de proliferação de pré-adipócitos 3T3-L1**. 2010. 90p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOROHAKU, K.; PELTON, S. H.; DAUGHERTY, D. J.; BUTLER, W. R.; DENG, W.; SELVARAJ, V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. **Endocrinology**, v. 155, p. 89-97, 2014.

MUKHERJEE, S.; DAS, S. K. Translocator protein (TSPO) in breast cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 443-457, 2012.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper's Biochemistry**, 25th ed., Appleton & Lange. Stamford, Connecticut, 2000. 785p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, New York: WH Freeman, 4 ed., (2005) 1119p.

NGUYEN, K. D.; QIU, Y.; CUI, X.; GOH, Y. P. S.; MWANGI, J.; DAVID, T.; MUKUNDAN, L.; BROMBACHER, F.; LOCKSLEY, R. M.; CHAWLA, A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 480, p. 104–108, 2011.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M.; HOSOYA, Y.; YAMASHITA, H.; FUJITA, H.; OHSUGI, M.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R.; SUGIURA, S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v. 56, p. 1517–1526, 2007.

NOVIKOFF, A. B.; NOVIKOFF, P. M.; ROSEN, O. M.; RUBIN, C. S. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. **J Cell Biol**, v. 87, p. 190-196, 1980.

O'BEIRNE, G. B.; WOODS, M. J.; WILLIAMS, D. C.; Two subcellular locations for peripheral-type benzodiazepine acceptors in rat liver. **Eur. J. Biochem**, v.188, p. 131-138. 1990.

OH, U.; FUJITA, M.; IKONOMIDOU, V. N.; EVANGELOU, I. E.; MATSUURA, E.; HARBERTS, E.; FUJIMURA, Y.; RICHERT, N. D.; OHAYON, J.; PIKE, V. W.; ZHANG,

Y.; ZOGHBI, S. S.; INNIS, R. B.; JACOBSON, S. J. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. **Neuroimmune Pharmacol**, v. 6, p. 354-361, 2011.

OKE, B. O.; SUAREZ-QUIAN, C. A.; RIOND, J.; FERRARA, P.; PAPADOPOULOS, V. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. **Mol Cell Endocrinol**, v. 87, p. R1-R6, 1992.

ORY, D.; POSTNOV, A.; KOOLE, M.; CELEN, S.; de LAAT, B.; VERBRUGGEN, A.; VAN LAERE, K.; BORMANS, G.; CASTEELS, C. Quantification of TSPO overexpression in a rat model of local neuroinflammation induced by intracerebral injection of LPS by the use of [(18) F] DPA-714 PET. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 1, 2015.

OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A. H.; IWAKOSHI, N. N.; OZDELEN, E.; TUNCMAN, G.; GÖRGÜN, C.; GLIMCHER, L. H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, p. 457–461, 2004.

PALACIOS-ORTEGA, S.; VARELA-GURUCEAGA, M.; ALGARABEL, M.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, J. A.; MIGUEL, C. Effect of TNF-alpha on caveolin-1 expression and insulin signaling during adipocyte differentiation and in mature adipocytes. **Cell Physiol Biochem**, v. 36, p. 1499-1516, 2015.

PANG, C.; GAO, Z.; YIN, J.; ZHANG, J.; JIA, W.; YE, J. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E313–E322, 2008.

PAPADOPOULOS, V. On the role of the translocator protein (18-kDa) TSPO in steroid hormone biosynthesis. **Endocrinology**, v. 155, p. 15-20, 2014.

PAPADOPOULOS, V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. **Endoc Rev**, v. 14, p. 222-240, 1993.

PAPADOPOULOS, V.; AMRI, H.; BOUJRAD, N.; VIDIC, B.; GARNIER, M. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. **Steroids**, v. 62, p. 21–28, 1997.

PAPADOPOULOS, V.; BARALDI, M.; GUILARTE, T. R.; KNUDSEN, T. B.; LACAPÈRE, J. J.; LINDEMANN, P.; NORENBURG, M. D.; NUTT, D.; WEIZMAN, A.; ZHANG, M. R.; GAVISH, M. Translocator Protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, p. 402–409, 2006.

PAPADOPOULOS, V.; LECANU, L. Translocator protein (18 kDa) TSPO: an emerging therapeutic target in neurotrauma. **Exp Neurol**, v. 219, p. 53-57, 2009.

PAPADOPOULOS, V.; MUKHIN, A. G.; COSTA, E.; KRUEGER, K. E. The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. **J. Biol. Chem**, v. 265, p. 3772-3779, 1990.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, p. 507–14, 2006.

POULAIN-GODEFROY, O.; FROGUEL, P. Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, p. 662-667, 2007.

RIBET, C.; MONTASTIER, E.; VALLE, C.; BEZAIRE, V.; MAZZUCOTELLI, A.; MAIRAL, A.; VIQUERIE, N.; LANGIN, D. Peroxisome proliferator-activated receptor- α control of lipid and glucose metabolism in human white adipocytes. **Endocrinology**, v. 151, p 123–33, 2010.

RISS, J.; CLOYD, J.; GATES, J; COLLINS, S. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. **Acta Neuro Scand**, v. 118, p. 69-86, 2008.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. The multiple facets of the fat tissue. **Thyroid**, v. 18, p. 175–183, 2008.

RUIZ, I.; OFFERMANN, J.; LANCTOT, K. L.; BUSTO, U. Comparative study on benzodiazepine use in Canada and Chile. **J Clin Pharmacol**, v. 33, p.124, 1993.

RUPPRECHT, R.; PAPADOPOULOS, V.; RAMMES, G.; BAGHAI, T. C.; FAN, J.; AKULA, N.; GROVER, G.; ADAMS, D.; SCHUMACHER, M. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. **Nat. Rev. Drug. Discov**, v. 9, p. 971-988, 2010.

SAANO, V. Central-type and peripheral-type benzodiazepine receptors. **Ann Clin Res**, v.20, p. 348-55, 1988.

SAKAI, M.; FONSECA, E.S.; DAGLI, M.L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sci**, v. 78, 1777–1783, 2006.

SALLES GOMES, C. O. M. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e resposta imune inata de equinos: efeitos do midazolam**. 2003. 125p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SCARF, A. M.; KASSIOU, M. The translocator protein. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, p. 677-680, 2011.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v. 377, p. 1949-61, 2011.

SELVA, D. M.; HAMMOND, G. L. Peroxisome-proliferator receptor γ repress hepatic sex hormone-binding globulin expression. **Endocrinology**, v. 150, p. 2183-2189, 2009.

SERRANO-MARCO, L.; CHACÓN, M. R.; MAYMÓ-MASIP, E.; BARROSO, E.; SALVADÓ, L.; WABITSCH, M.; GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; TINAHONES, F. J.; PALOMER, X.; VENDRELL, J.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. TNF- α inhibits PPAR β/δ activity and SIRT1 expression through NF- κ B in human adipocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 9, p. 1177-85, 2012.

SHANY, E.; HOCHHAUSER, E.; HALPERN, P.; VIDNE, B.; GAVISH, M.; GELLER, E.; HASHARONI, A.; BARAK, Y.; YAKIREVICH, V. Ro5-4864 has a negative inotropic effect on human trial muscle strips that is not antagonized by PK 11195. **Eur J Pharmacol**, v. 253, p. 231-236, 1994.

SHELDON, H.; HOLLENBERG, C. H.; WINEGRAD, A. L. Observations on the morphology of adipose tissue. I. The fine structure of cells from fasted and diabetic rats. **Diabetes**, v. 11, p. 378-387, 1962.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793–1801, 2006.

SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; SÁ-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S. F. A.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 97-104, 2003.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**.3.ed. New York: W. H. Freeman, 1995. 887p.

SOLVEYRA, C. G.; ROMEO, H. E.; ROSESTEIN, R. E.; ESTEVEZ, A. G.; CARDINALI, D. P. Benzodiazepine binding sites in rat interescapular brown adipose tissue: effect of cold environment, denervation and endocrine ablations. **Life Sciences**, v. 42, p. 392-402, 1988.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, p. 2062–8, 2005.

SUTHERLAND, L. N.; CAPOZZI, L. C.; TURCHINSKY, N. J.; BELL, R. C.; WRIGHT, D. C. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. E1076–E1083, 2008.

TAKETANI, S.; KOHNO, H.; FURUKAWA, T.; TOKUNAGA, R. Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. **J Biochem**, v. 117, p. 875–880, 1995.

THOMPSON, M. M.; MANNING, H. C.; ELLACOT, K. L. J. Translocator protein 18 kDa (TSPO) is regulated in white and brown adipose tissue by obesity. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-10, 2013.

TU, L. N.; MOROHAKU, K.; MANNA, P. R.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R.; STOCCO, D. M.; SELVARAJ, V. Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 27444-454, 2014.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, v. 35, p. W71-W74, 2007.

VÁGÁNI, V.; SMITH, A. G. Complicity of haem in some adverse drug-reaction. **Toxicology Research**, v. 4, p. 1128-1142, 2015.

VAN DE WIELE, C.; SATHEKGE, M.; MAES, A. Targeting monocytes and macrophages by means of SPECT and PET. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 58, p. 269-75, 2014.

VAN DER LAKEN, C. J.; ELZINGA, E. H.; KROPHOLLER, M. A. MOLTHOF, C. F.; VAN DER HEIJDEN, J. W.; MARUYAMA, K.; BOELLAARD, R.; DIJKMANS, B. A.; LAMMERTSMA, A. A.; VOSKUYL, A. E. Noninvasive imaging of macrophages in rheumatoid synovitis using ¹¹C-(R)-PK11195 and positron emission tomography. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 3350-3355, 2008.

VEENMAN, L.; GAVISH, M. Peripheral-type benzodiazepine receptors: their implication in brain disease. **Drug Dev. Res**, v. 50, p. 355–370, 2000.

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 23852405, 2007.

VEENMAN, L.; PAPADOPOULOS, V.; GAVISH, M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2385-2405, 2007.

VENNETI, S.; LOPRESTI, B. J.; WILEY, C. A. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18 kDa) in microglia: from pathology to imaging. **Prog Neurobiol**, v. 80, p. 308-322, 2006.

VOWELLS, S. J.; SEKHSARIA, S.; MALECH, H. L.; SHALIT, M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, p. 89-97, 1995.

WADE, F. M.; WAKADE, C.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Differential expression of the peripheral benzodiazepine receptor and gremlin during adipogenesis. **Obesity Research**, v. 13, p. 818-822, 2005.

WHO. World Health Organization. **Noncommunicable diseases country profiles 2011**. Geneva: WHO, 2011.

WHO. World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report a WHO Consultation on Obesity**. Geneva: WHO, 2000.

WILLIAMSON, J. R. Adipose tissue. Morphological changes associated with lipid mobilization. **J Cell Biol**, v. 20, p. 57-74, 1964.

WILSON-FRITCH, L.; BURKART, A.; BELL, G.; MENDELSON, K.; LESZYK, J.; NOCOLORO, S.; CZECH, M.; CORVERA, S. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 1085-1094, 2003.

WOODS, J. H., KATZ, J. L., WINGER, G. Benzodiazepines: Use, abuse, and consequences. **Pharmacol. Rev. Baltimore**, v. 44, p. 151-347, 1992.

YE, J.; GAO, Z.; YIN, J.; HE, H. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, p. E1118–E1128, 2007.

YE, J.; MCGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, p. E466-E477, 2013.

YOUSEFI, O. S.; WILHELM, T.; MASCHKE-NEUB, K.; KUHN, M.; MARTIN, C.; MOLDERINGS, G. J.; KRATZ, F.; HILDENBRAND, B.; HUBER, M. The 1,4 – benzodiazepine Ro5-4864 (4-chlorodiazepam) suppresses multiple pro-inflammatory mast cell effector functions. **Cell Communications and Signaling**, v. 11, p. 1-15, 2013.

ZAVALA, F. Benzodiazepines, anxiety and immunity. **Pharmacol Ther**, v. 75, p. 199–216, 1997.

ZAVALA, F.; HAUMONT, J.; LENFANT, M. Interactions of benzodiazepines with mouse macrophages. **Eur J Pharmacol**, v. 106, p. 561-566, 1984.

ZAVALA, F.; LENFANT, M. Peripheral benzodiazepines enhance the respiratory burst of macrophage-like P388D1 cells stimulated by arachidonic acid. **Int. Immunopharmacol**, v. 9, p. 269–274, 1987.

ZAVALA, F.; TAUPIN, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. In vivo treatment with benzodiazepines inhibits murine phagocyte oxidative metabolism and production of interleukin 1, tumor necrosis factor and interleukin-6. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 255, p. 442–450, 1990.

ZENO, S.; VEENMAN, L.; KATZ, Y.; BODE, J.; GAVISH, M.; ZAAROR, M. The 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) prevents accumulation of protoporphyrin IX. Involvement of reactive oxygen species (ROS). **Curr Mol Med**, v. 12, p. 494-501, 2012.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Adipose tissue macrophages. **Immunology letters**, v. 112, p. 61-67, 2007.

ZHANG, H.; MATSUDA, H.; YAMASHITA, C.; NAKAMURA, S.; YOSHIKAWA, M. Hydrangeic acid from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thumbergii* as a new type of anti-diabetic compound. **European Journal of Pharmacology**, v. 606, p. 255-261, 2009.

ZHANG, Y.; MARSBOOM, G.; TOTH, P. T.; REHMAN, J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **PLoS ONE**, v. 8, p. 1-12, 2013.

ZHENG, J.; BOISGARD, R.; SIQUIER-PERNET, K.; DECAUDIN, D.; DOLLÉ, F.; TAVITIAN, B. Differential expression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) by neoplastic and inflammatory cells in mouse tumors of breast cancer. **Mol. Pharm**, v. 8, p. 823-832, 2011.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

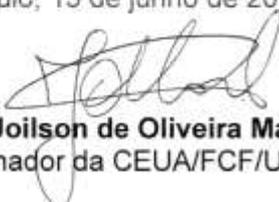
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 32.2015-P498

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**INTERFERÊNCIA DO TSPO SOBRE AS VIAS DE ATIVAÇÃO DE ADIPÓCITOS DA LINHAGEM 3T3-L1**" (Protocolo CEUA/FCF/498), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **ERIC DIEGO BARIONI**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **12 de junho de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de junho de 2015.


Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO 2 – CURRÍCULO DA PLATAFORMA LATTES

Eric Diego Barioni

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1110315289116810>
Última atualização do currículo em 27/10/2017.

Éric Diego Barioni é graduado em biomedicina pelo Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP) de Itu - SP (2006-2009); obteve título de mestre em ciências com área de concentração em toxicologia e análises toxicológicas pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP/SP) em 2013, e é doutorando em ciências com área de concentração em toxicologia e análises toxicológicas pelo mesmo departamento. Atualmente é Professor Assistente II - RE e Coordenador do Curso de Graduação em Biomedicina na Universidade de Sorocaba (UNISO) e Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas do Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde do Estado de São Paulo (IPESSP). Éric Diego Barioni é Delegado Regional do Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região em Sorocaba e Região, obteve título de especialista em Toxicologia pela Associação Brasileira de Biomedicina (ABBM; 2016); é habilitado em Análises Clínicas (Patologia Clínica) e Toxicologia pelo Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região (CRBM-1) e coordenador geral do corpo editorial do boletim INFOTOX da Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox). Além disso, é Presidente da Comissão de Toxicologia e Conselheiro Honorário do Conselho Regional de Biomedicina da 1ª Região (CRBM-1). Membro do Conselho Fiscal da Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox; gestão 2016-2017). Membro da Associação Brasileira de Biomedicina (ABBM). Membro da Diretoria e Conselho Fiscal da Associação Paulista de Biomedicina (APBM; gestão 2017-2018). Sua linha de pesquisa investiga o comprometimento de vias inflamatórias de adipócitos e macrófagos expostos a xenobióticos. Assuntos correlacionados: plantas medicinais; inflamação; imunotoxicologia; TSPO; PPAR. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Eric Diego Barioni 
Nome em citações bibliográficas	BARIONI, E. D.; BARIONI, ÉRIC DIEGO

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13B Cidade Universitária 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912197 URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2013	Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Interferência do TSPO sobre as vias de ativação de adipócitos da linhagem 3T3-L1. Orientador:  Profª Tit. Drª Sandra Helena Polisseli Farsky. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2011 - 2013	Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA INFLDRESCÊNCIA DA Achyrocline satureoides SOBRE A FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO., Ano de Obtenção: 2013. Orientador:  Profa. Dra. Sandra Helena Polisseli Farsky. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2006 - 2009	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil. Título: As Principais Alterações Orgânicas Provocadas pelo uso do Crack. Orientador: Prof. Ms. Jadson de Oliveira Silva.
2002 - 2004	Ensino Médio (2º grau). E.M. Dr. Achilles de Almeida, EMAA, Brasil.
1998 - 2001	Ensino Fundamental (1º grau). E.M. Dr. Achilles de Almeida, EMAA, Brasil.

1994 - 1997 Ensino Fundamental (1º grau).
E.E.P.G Prof. Roberto Paschoalick, EEPGRP, Brasil.

Formação Complementar

2016 - 2016	Extensão universitária em Zika Vírus: Atualização e Diagnóstico Laboratorial. (Carga horária: 1h). Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região, CRBM-1, Brasil.
2016 - 2016	Extensão universitária em Métodos e Técnicas em Biologia Molecular. (Carga horária: 3h). Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região, CRBM-1, Brasil.
2016 - 2016	HOW TO WRITE A SCIENTIFIC PAPER: THEORY AND PRACTICE. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, SBFTE, Brasil.
2015 - 2015	Extensão universitária em Acupuntura e Fitoterapia. (Carga horária: 4h). Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região, CRBM-1, Brasil.
2015 - 2015	Extensão universitária em Medical Aspects of Chemical Weapons. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Identificação da Malária Pulmonar Grave: EMM. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Métodos Inovadores de Ensino de Graduação. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Thomson Reuters Integrity. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2012 - 2012	Extensão universitária em Neuroinflamações e Doenças Neurodegenerativas. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Logística de Medicamentos. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Descartes Laboratoriais. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Sistema de Imagem em Alto Conteúdo. (Carga horária: 3h). Molecular Devices do Brasil, MD, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Aplicação de Nanopartículas na Área Farmacêutica. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em ApoCIII, a risk factor for Diabetes. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Toll Like Receptor. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Primeiros Socorros/Acidentes no Lar. (Carga horária: 1h). Fundação São Paulo - Hospital Santa Lucinda, HSL, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Manutenção do equip. COBAS B 221. (Carga horária: 5h). AIMARA - Comércio e Representações LTDA., AIMARA, Brasil.
2009 - 2009	Treinamento Técnico Comercial 2009. (Carga horária: 30h). Biotécnica Indústria e Comércio, BIOTECNICA, Brasil.
2009 - 2009	VI Semana de Estudos. (Carga horária: 16h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil.
2009 - 2009	Qnd e como discutir casos de medicina molecular. (Carga horária: 1h). Total Laboratórios / Serviço de Apoio a Laboratórios, SAL, Brasil.
2008 - 2008	Gerenciamento e Conservação do Sangue. (Carga horária: 6h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil.
2008 - 2008	O Lab. Clin. no diag. das doenças auto-imunes. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, SBPC/ML, Brasil.
2008 - 2008	V Semana de Estudos. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil.
2007 - 2007	IV Semana de Estudos. (Carga horária: 40h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil.
2006 - 2006	III Semana de Estudos. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio, CEUNSP, Brasil.

Atuação Profissional

Associação Brasileira de Biomedicina, ABBM, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - Atual Vínculo: Comissão de Toxicologia, Enquadramento Funcional: Comissão de Toxicologia

Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região, CRBM-1, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - Atual Vínculo: Delegado, Enquadramento Funcional: Delegado

Vínculo institucional
2015 - Atual Vínculo: Conselheiro Honorário, Enquadramento Funcional: Conselheiro Honorário
Outras informações Conselheiro Honorário do Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região (CRBM-1).

Vínculo institucional
2015 - Atual Vínculo: Membro de Comissão Toxicologia, Enquadramento Funcional: Membro de Comissão

Universidade de Sorocaba, UNISO, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professor e Coordenador, Carga horária: 40
Outras informações Professor Assistente II - RE Coordenador do curso de graduação em Biomedicina

Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - 2017 Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professor da Diretoria de Saúde II, Carga horária: 24

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2013 - Atual Vínculo: Aluno de Doutorado, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 40,
Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional
2015 - 2016 Vínculo: CEUA/FCF/USP, Enquadramento Funcional: Representante discente
Outras informações Representante discente na Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP/SP

Vínculo institucional
2011 - 2013 Vínculo: Aluno de Mestrado, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 40,
Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional
2011 - 2012 Vínculo: Comissão de Pós Graduação, Enquadramento Funcional: Representante discente

Vínculo institucional
2011 - 2012 Vínculo: Comissão de Ética em Pesquisa, Enquadramento Funcional: Representante discente

Associação Paulista de Biomedicina, APBM, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - Atual Vínculo: Diretoria e conselho fiscal, Enquadramento Funcional: Diretoria e conselho fiscal

Sociedade Brasileira de Toxicologia, SBTOx, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - Atual Vínculo: Membro do Conselho Fiscal, Enquadramento Funcional: Membro do Conselho Fiscal

Vínculo institucional
2015 - Atual Vínculo: Coordenação INFOTOX, Enquadramento Funcional: Coordenador geral

Associação Policial de Assistência a Saúde - Labormed, APAS - LABORMED, Brasil.

Vínculo institucional
2010 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Biomédico, Carga horária: 40
Outras informações Biomédico responsável pelo Laboratório do Hospital Santa Lucinda.

RCL - Comercial, RCL, Brasil.

Vínculo institucional
2009 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Assessor Científico, Carga horária: 40

Colégio Atox, ATOS, Brasil.

**Vínculo institucional
2009 - 2010**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 8

Colégio CENEP, CENEP, Brasil.

**Vínculo institucional
2008 - 2010**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 8

Colégio Archimedes, ARCHIMEDES, Brasil.

**Vínculo institucional
2008 - 2008**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 4

Lab. Clín. Trianálses, TRIANÁLISES, Brasil.

**Vínculo institucional
2006 - 2008**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Plantonista, Carga horária: 36

Vidágua Comércio e Distribuidora de Águas Minerais LTDA, VIDÁGUA, Brasil.

**Vínculo institucional
2005 - 2006**

Vínculo: Regido pelas normas da CLT, Enquadramento Funcional: Vendedor, Carga horária: 40

Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde de São Paulo, IPESP, Brasil.

**Vínculo institucional
2017 - Atual**

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor de pós-graduação e coordenação

Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

**Vínculo institucional
2017 - Atual**

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor de pós-graduação

Universidade Anhembi Morumbi, UAM, Brasil.

**Vínculo institucional
2017 - Atual**

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor de pós-graduação

Projetos de pesquisa**2017 - Atual**

ESTUDO SOBRE A PREVALÊNCIA, CRENÇAS E ATITUDES RELACIONADAS AO USO DE NARGUILÉ EM JOVENS DE UMA ESCOLA PÚBLICA DE SOROCABA - SP.
 Descrição: O abuso de drogas por adolescentes tem sido cada vez mais frequente, e estas drogas, sejam lícitas (álcool, cigarro, etc.) ou ilícitas (crack, maconha, cocaína, etc.), são utilizadas para impressionar, fugir de frustrações (bullying, desentendimento familiar, solidão), acalmar, amenizar casos de ansiedade, depressão e/ou baixa autoestima. Assim, depois do álcool, o tabaco é a segunda droga psicoativa mais consumida por adolescentes, e a utilização do tabaco evoluiu e deixou de ser representado apenas pela utilização de cigarro tradicional, fumo de corda e cigarro de uso caseiro. Atualmente, entre as novas formas está o uso do narguilé. Muito comum no Oriente, o narguilé tem chamado atenção dos jovens ocidentais e, apesar da diminuição do uso de tabaco por meio do uso de cigarros tradicionais, o uso de Narguilé, principalmente entre jovens e famílias inteiras do Ocidente, tem crescido exponencialmente. Ademais, a toxicidade do Narguilé, comparada ao cigarro tradicional, é demasiadamente mais intensa, e isto contribui para o surgimento precoce de doenças crônicas e/ou infecciosas. Assim, visto que o narguilé, além de ser muito mais tóxico que o cigarro tradicional, tem sido tratado como uma forma segura para uso de tabaco; tem atraído jovens e adultos do Ocidente, e tal mecanismo de atração já chegou às cidades brasileiras, difundindo-se em bares e entre as rodas de amigos, o presente trabalho tem por objetivo identificar o perfil de utilização e o conhecimento sobre narguilé entre jovens do ensino médio de uma escola pública de Sorocaba - SP. Para tanto, este projeto de pesquisa será desenvolvido por amostragem, com aproximadamente 100 estudantes do ensino médio. Serão entrevistados homens e mulheres de ambos os sexos. Este estudo irá realizar uma varredura nas escolas, buscando analisar a utilização, os conhecimentos sobre o uso de narguilé, e investigando suas múltiplas dimensões. Serão levantadas informações sobre toxicidade, uso de tabaco e essências, e o risco de doenças

infecciosas associadas ao uso de pteiras compartilhadas. A coleta de dados será realizada a partir de um questionário semi-estruturado, individual e fechado, elaborado e aplicado pelos autores, cujas questões identificarão a percepção dos sujeitos envolvidos, buscando dados relacionados às práticas que envolvam o manuseio deste dispositivo. Por fim, destacamos que para entender a dimensão do problema entre os jovens, são necessários levantamentos nacionais, que infelizmente não possuímos. Assim, para contribuir com a literatura científica nacional, estudos regionais que visem identificar a real situação com relação ao conhecimento e uso de narguilé entre jovens são extremamente necessários e podem nortear órgãos e políticas públicas. Ademais, nossa intenção não é apenas identificar o problema, mas criar ações nas escolas, e contribuir para uma possível mudança de cenário..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) .

2017 - Atual

Integrantes: Eric Diego Barioni - Coordenador / Ana Elisa Rubinato Cavalheiro - Integrante / Daiane Cristina da Silva Pereira Nunes - Integrante.

AVALIAÇÃO DO RISCO DE INTOXICAÇÕES POR DOMISSANITÁRIOS NA POPULAÇÃO DO BAIRRO PARQUE SÃO CAMILO EM ITU - SP

Descrição: Com o crescimento da indústria e avanço da tecnologia, várias substâncias de utilidade doméstica, capazes de provocar intoxicações, surgiram e estão facilmente disponíveis em produtos químicos, tais como os domissanitários. As intoxicações por domissanitários compreendem um grave problema de saúde pública, e o número de casos de intoxicação por domissanitários aumenta dia após dia. Ainda, a população carece de informações sobre cuidados básicos de saúde em casos de intoxicação, desconhece a importância e as informações contidas em rótulos e embalagens de produtos domissanitários, e não considera perigosos produtos domissanitários próximos a crianças e animais domésticos. Assim, o objetivo do presente projeto será avaliar e compreender a percepção do risco de intoxicações por domissanitários na população do bairro Parque São Camilo da cidade de Itú ? SP, e determinar como os moradores compreendem e vivenciam as intoxicações, como obtêm informações sobre os produtos saneantes e de que maneira reagem a estes casos. Este projeto de pesquisa será desenvolvido por amostragem com aproximadamente 100 moradores do bairro Parque São Camilo da cidade de Itú ? SP. Serão entrevistados homens e mulheres, moradores do bairro, com idade igual ou superior a 30 anos. Este estudo irá realizar uma varredura neste bairro, buscando analisar a manipulação e utilização de produtos domissanitários e investigando suas múltiplas dimensões. Serão observadas informações sobre rotulagem, estocagem e aplicação de produtos de limpeza em uma localidade predominantemente de baixa renda. A coleta de dados será realizada a partir de um questionário semiestruturado, individual e fechado, elaborado e aplicado pelos autores, cujas as questões identificarão a percepção dos sujeitos envolvidos, buscando dados relacionados às práticas que envolvam o manuseio de substâncias químicas habitualmente utilizadas nas residências. Por fim, esperamos que os resultados nos tragam informações importantes sobre como a população reage em casos de intoxicação por domissanitários. Além disso, entender o conhecimento da população sobre o risco do uso e armazenamento inadequado de domissanitários, como obtêm informações a respeito destes produtos, e as experiências toxicológicas envolvendo domissanitários que já presenciaram..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

2013 - Atual

Integrantes: Eric Diego Barioni - Coordenador / Talita Ferreira do Nascimento - Integrante. **INTERFERÊNCIA DO TSPO SOBRE AS VIAS DE ATIVAÇÃO DE ADIPÓCITOS DA LINHAGEM 3T3-L1**

Projeto certificado pelo(a) coordenador(a) Sandra Helena Polisseli Farsky em 11/12/2014.

Descrição: A obesidade é associada a uma inflamação crônica de baixa intensidade e representa um dos fatores de risco para o desenvolvimento de uma série de comorbidades, tais como a resistência à insulina e o desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 2. Os receptores TSPO (translocator protein 18kDa) estão envolvidos em inúmeras funções celulares, incluindo biossíntese e transporte de esteróides, transporte de porfirinas, apoptose, biossíntese do heme, transporte de íons, respiração celular, processos oxidativos e imunomodulação. No entanto, a presença e a função de receptores TSPO na obesidade ainda não estão estabelecidas. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de esclarecer o papel imunomodulador de receptores TSPO e, desta forma, no presente projeto serão avaliadas a expressão e função de receptores TSPO em células adiposas da linhagem 3T3-L1, bem como a ação do TSPO na polarização de macrófagos Raw 264.7.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .

2011 - 2013

Integrantes: Eric Diego Barioni - Integrante / Sandra Helena Polisseli Farsky - Coordenador. **CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA Achyrocline satureoides SOBRE A FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO.**

Descrição: Desde a antiguidade, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças e, gradativamente, o uso destes medicamentos naturais tem aumentado, porém, na maioria das vezes, o emprego do medicamento popular é realizado sem critérios adequados, ou seja, sem a fundamentação necessária na literatura para o uso, o que em algumas vezes, poderá resultar em efeitos indesejáveis e tóxicos. *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C., popularmente conhecida como marcela, marcela do campo, macelinha, macela ou camomila-nacional é muito utilizada popularmente para tratar males do estômago e do intestino, problemas respiratórios, anemias, inflamações, infecções virais, diabetes e doenças de próstata. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de esclarecer os mecanismos anti-inflamatórios das inflorescências da Marcela. No presente projeto serão investigadas as ações do extrato das inflorescências da *Achyrocline satureioides* sobre as funções de neutrófilos.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Eric Diego Barioni - Integrante / Sandra Helena Polisseli Farsky - Coordenador.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

Membro de corpo editorial

2015 - Atual Períódico: INFOTOX

Membro de comitê de assessoramento

2016 - Atual Agência de fomento: Associação Brasileira de Biomedicina

2015 - Atual Agência de fomento: Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região

2015 - Atual Agência de fomento: Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região

2015 - Atual Agência de fomento: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

2011 - 2012 Agência de fomento: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

2011 - 2012 Agência de fomento: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Revisor de periódico

2017 - Atual Períódico: Journal of Herbal Medicine

2017 - Atual Períódico: FITOTERAPIA

2017 - Atual Períódico: LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY

Áreas de atuação

- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Anatomia Patológica e Patologia Clínica/Especialidade: Patologia Clínica.
- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Avaliação e análises toxicológicas.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2017 Menção Honrosa para o TCC da estudante Camila Anacleto Pedro Bom (melhor trabalho), Centro Universitário Hermínio Ometto.

2017 Delegado Titular do Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região na cidade de Sorocaba - SP e região metropolitana., Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região (CRBM-1).

2016 Título de Especialista em Toxicologia, Associação Brasileira de Biomedicina (ABBM).

2016 Honorable Mention during the 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE).

2016 Votos de Congratulações pelo dia do Biomédico, Câmara dos Vereadores de Sorocaba.

2015 Conselheiro Honorário do Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região, Conselho Regional de Biomedicina 1ª Região.

2013 Mestre em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

2012 2º lugar no prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

- GOES, S.; **BARIONI, E. D.**; IGNACIO, A.; ALBUQUERQUE, J.; CAMARA, N. O. S.; PAVANI, C.; VITORETTI, L. B.; DAMAZO, A. S.; FARSKY, S. H. P.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. *Scientific Reports* **JCR**, v. 7, p. 1-12, 2017.
Citações: SCOPUS 2
- KUPA, L. V. K.; DREWES, C. C.; **BARIONI, E. D.**; NEVES, C. L.; SAMPAIO, S. C.; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI. Role of Translocator 18 KDa Ligands in the Activation of Leukotriene B4 Activated G-Protein Coupled Receptor and Toll Like Receptor-4 Pathways in Neutrophils. *Frontiers in Pharmacology* **JCR**, v. 8, p. 1-14, 2017.
- IBRAHIM, BEATRIZ SILVA; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; HELUANY, CÍNTIA; BRAGA, TÁRCIO TEODORO; DREWES, CARINE CRISTIANE; COSTA, SILVIA GOES; CÂMARA, NIELS OLSEN SARAIVA; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, ADRIANA. Beneficial effects of vitamin C treatment on pregnant rats exposed to formaldehyde: Reversal of immunosuppression in the offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* **JCR**, v. 300, p. 77-81, 2016.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 1 | SCOPUS 1
- SILVA MACEDO, RODRIGO; PERES LEAL, MAYARA; BRAGA, TARCIO TEODORO; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; DE OLIVEIRA DURO, STEPHANIE; RATTO TEMPESTINI HORLIJANA, ANNA CAROLINA; CÂMARA, NIELS OLSEN SARAIVA; MARCOURAKIS, TÂNIA; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, ADRIANA. Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes, Mediators of Inflammation (Print) **JCR**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
Citações: SCOPUS 3
- SILVA IBRAHIM, BEATRIZ; MIRANDA DA SILVA, CRISTIANE; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; CORREA-COSTA, MATHEUS; DREWES, CARINE CRISTINA; SARAIVA CÂMARA, NIELS OLSEN; TAVARES-DE-LIMA, WOTHAN; POLISELLI FARSKY, SANDRA HELENA; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, ADRIANA. Formaldehyde inhalation during pregnancy abolishes the development of acute innate inflammation in offspring. *Toxicology Letters* **JCR**, v. 235, p. 147-154, 2015.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 7 | SCOPUS 8
- BARIONI, E. D.**; Santin, J. R.; Machado, I.; Rodrigues, S.; Ferraz-de-Paula, V.; WAGNER, T. M.; COGLIATI, B.; CORREA, M.; MACHADO, M. S.; Andrade, S. F.; Niero, R.; FARSKY, S. H. P.. Achyrocline satureoides (Lam) D.C. HYDROALCOHOLIC EXTRACT INHIBITS NEUTROPHIL FUNCTIONS RELATED TO INNATE HOST DEFENSE. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **JCR**, v. 2013, p. 1/ 787916-12, 2013.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 7 | SCOPUS 11

Textos em jornais de notícias/revistas

- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Foto na Toxicologia. *Revista do Biomédico*, p. 01 - 24, 01 abr. 2017.
- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Sessão solene em Sorocaba homenageia Biomédicos. Conselho Federal de Biomedicina (CFBM). Notícias do site, 04 jan. 2017.
- BARIONI, ÉRIC DIEGO;** LOIOLA, R. A. . Os efeitos da Macela sobre as funções neutrofílicas ligadas a inflamação. Conselho Federal de Biomedicina, Site, 02 fev. 2016.
- BARIONI, ÉRIC DIEGO;** LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, ADRIANA. Fototerapia e doenças pulmonares crônicas: uma nova luz no fim do túnel. *Revista do Biomédico*, p. 03 - 23, 17 dez. 2015.

Apresentações de Trabalho

- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Os desafios da toxicologia social: novas drogas de abuso, tolerância e síndrome de abstinência. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** O Biomédico para a toxicologia versus a toxicologia para o biomédico: carreira, desafios e oportunidades. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Fisiopatologia da dor e inflamação. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** A Biomedicina para os desafios da Toxicologia: carreira e oportunidades. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- BARIONI, ÉRIC DIEGO.** A Toxicologia para o Biomédico vs O Biomédico para a Toxicologia: carreira, desafios e oportunidades. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- MACEDO, R.; GOMES, F.; LEAL, M.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; BRAGA, T.; CAMARA, N. O. S.; POLISELLI FARSKY, SANDRA HELENA; FRANCO, A. L. S. . Low Level Laser Treatment Reduces Oxidative Stress Induced by Formaldehyde

- Exposure by the Modulation of Gene Expression of Oxidant and Antioxidant Enzymes in the Lung. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 8. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 9. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 10. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Drogas de Abuso. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 11. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Farmacologia dos Anti-Inflamatórios e Analgésicos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 12. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Farmacologia dos Anti-Inflamatórios e Analgésicos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 13. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 14. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Farmacologia dos Antimicrobianos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 15. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 16. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Doenças autoimunes, endócrinas e câncer: o impacto negativo de xenobióticos no desenvolvimento da resposta imune inata. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 17. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Atualização em Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 18. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** A Toxicologia para o Biomédico vs O Biomédico para a Toxicologia: carreira, desafios e oportunidades. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 19. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Farmacocinética e Farmacodinâmica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 20. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Drogas vasoativas, sedação, analgesia e corticoides em terapia intensiva. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 21. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** O Biomédico para a Toxicologia: um horizonte de novos desafios. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 22. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** A Toxicologia para o Biomédico vs o Biomédico para a Toxicologia: carreira, desafios e oportunidades. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 23. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Apresentação do profissional Biomédico. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 24. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Apresentação do profissional Biomédico. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 25. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** A Toxicologia para o Biomédico vs o Biomédico para a Toxicologia: carreira, desafios e oportunidades. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 26. **BARIONI, E. D.;** ROCHA, G. H. O. ; OLIVEIRA, E. M. ; CAMPA, A. ; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI . Translocator Protein 18kDa (TSPO): A New Promising Target for Meta-Inflammation. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 27. **BARIONI, E. D.** Farmacologia dos antimicrobianos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 28. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** IMUNOTOXICOLÓGIA. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 29. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** TOXICOLOGIA E BIOMEDICINA: de que maneira o profissional biomédico poderá contribuir positivamente e qual a importância da toxicologia no cenário biomédico atual?. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 30. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Toxicologia. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 31. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Biomédico: um horizonte de possibilidades e novos desafios. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 32. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** O Biomédico para a toxicologia vs a toxicologia para o biomédico: carreira, desafios e oportunidades. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 33. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Fitoterapia: aspectos toxicológicos versus possibilidades terapêuticas. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 34. **BARIONI, E. D.** Linhas de Pesquisa do Laboratório de Toxicologia Experimental. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 35. **BARIONI, E. D.;** LOIOLA, R. A. ; OLIVEIRA, E. M. ; CAMPA, A. ; FARSKY, S. H. P. . TSPO GENE EXPRESSION ON 3T3-L1 DIFFERENTIATION IS MODULATED BY DIAZEPAM TREATMENT AND LPS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 36. PANTALEAO, L. N. ; LOIOLA, R. A. ; **BARIONI, E. D.;** PERRETTI, M. ; SOLITO, E. ; FARSKY, S. H. P. . ANNEXIN A1 MODULATES THE LPS INDUCED TSPO EXPRESSION IN BV2 CELLS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 37. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Fitoterapia: Aspectos Toxicológicos versus Possibilidades Terapêuticas. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 38. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Fitoterápicos na prevenção do envelhecimento cutâneo precoce. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 39. PANTALEAO, L. ; LOIOLA, R. A. ; **BARIONI, ÉRIC DIEGO;** FARSKY, S. H. P. . Diazepam reduces toxicity in microglia under inflammatory conditions. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 40. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Fisiopatologia do sistema cardiovascular. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 41. **BARIONI, ÉRIC DIEGO.** Interações Medicamentosas: quando não indicar ou recomendar um ou mais fitoterápicos?. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 42. **BARIONI, E. D.** O tecido adiposo e as doenças cardiovasculares e metabólicas associadas à obesidade. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 43. **BARIONI, E. D.** INFLAMAÇÃO. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 44. **BARIONI, E. D.** Alterações Imunotoxicológicas e os Fundamentos Básicos da Imunidade Inata e Adquirida. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 45. **BARIONI, E. D.** Plantas Medicinais: Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 46. **BARIONI, E. D.** Imunotoxicologia: Os Aspectos Celulares da Imunidade Inata e Adquirida e as Alterações Induzidas por Xenobióticos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
 47. IBRAHIM, B. S. ; **BARIONI, E. D.;** LIMA, W. T. ; FARSKY, S. H. P. ; FRANCO, A. L. S. . Exposure to Formaldehyde During Pregnancy Lung Infection in Offspring. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

48. **BARIONI, E. D.**, A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA BIOMÉDICA E OS BENEFÍCIOS DO USO RACIONAL DE FITOTERÁPICOS. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
49. Rodrigues, S.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Microscopia Intravital. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
50. **BARIONI, E. D.**, Abuso de drogas, síndrome de abstinência e tolerância. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
51. **BARIONI, E. D.**, Atuação do Biomédico em Pesquisa. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
52. **BARIONI, E. D.**; Santin, J. R.; Shimada, A. L.; Rodrigues, S.; Machado, I.; Ferraz-de-Paula, V.; Niero, R.; Andrade, S. F.; FARSKY, S. H. P. . O TRATAMENTO ORAL COM Achyrocline satureoides (Lam.) D.C., PREVINE A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS NO MODELO DE BOLSA DE AR. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
53. **BARIONI, E. D.**; Santin, J. R.; Shimada, A. L.; Rodrigues, S.; Machado, I.; Ferraz-de-Paula, V.; Niero, R.; Andrade, S. F.; FARSKY, S. H. P. . ORAL ADMINISTRATION OF Achyrocline satureoides EXTRACT PREVENTS IN VIVO NEUTROPHIL MIGRATION INDUCED BY LPS. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
54. **BARIONI, E. D.**; Santin, J. R.; Shimada, A. L.; Rodrigues, S.; Machado, I.; Ferraz-de-Paula, V.; Niero, R.; Andrade, S. F.; FARSKY, S. H. P. . Achyrocline satureoides (LAM) D.C. EXTRACT TREATMENT PREVENTS NEUTROPHIL MIGRATION IN AIR POUCH MODEL. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
55. **BARIONI, E. D.**, Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
56. **BARIONI, E. D.**; DREWES, C. C.; SIMONS, S. M.; TAVASSI, A. M. C.; FARSKY, S. H. P. . Study of the Action of the Serine Protease Inhibitor Amblyomin-X on Properties Adhesives and Migration of Cancer Cells Lineage SK-MEL-28. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Outras produções bibliográficas

1. OLIVEIRA, D. P.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; DORTA, D. J. . INFOTOX (nº 06). São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox), 2017 (Boletim).
2. OLIVEIRA, D. P.; **BARIONI, E. D.**; ALMEIDA, R. M.; DORTA, D. J. . INFOTOX (nº 07). São Paulo: SBTox, 2017 (Boletim).
3. OLIVEIRA, D. P.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; DORTA, D. J. . INFOTOX (nº 03). São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2016 (Boletim).
4. OLIVEIRA, D. P.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; DORTA, D. J. . INFOTOX (nº 04). São Paulo: SBTox, 2016 (Boletim).
5. OLIVEIRA, D. P.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; DORTA, D. J. . INFOTOX (nº 05). São Paulo - SP: Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox), 2016 (Boletim).
6. DORTA, D. J.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; OLIVEIRA, D. P. . INFOTOX (nº 01). São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2015 (Boletim).
7. DORTA, D. J.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; ALMEIDA, R. M.; OLIVEIRA, D. P. . INFOTOX (nº 02). São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox), 2015 (Boletim).

Produção técnica

Assessoria e consultoria

1. OLIVEIRA, D. C.; OZAWA, E.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Vídeo em homenagem ao dia do Biomédico. 2016.

Trabalhos técnicos

1. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Parecerista para o Guia do Estudante da Editora Abril. 2017.

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **BARIONI, E. D.**; GONCALVES, E. M.; VARANDA, P. C. . A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA BIOMÉDICA E OS BENEFÍCIOS DO USO RACIONAL DE FITOTERÁPICOS. 2014. (Programa de rádio ou TV/Mesa redonda).

Demais tipos de produção técnica

1. YABIKU, F. M.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Projeto de Lei que institui o dia do Biomédico em Sorocaba. 2016. (Parecer técnico).
2. **BARIONI, E. D.**, Parecer técnico sobre a Resolução CONTRAN n. 460. 2014. (Parecer técnico).
3. **BARIONI, E. D.**, Atuação Profissional em Pesquisa. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
4. **BARIONI, E. D.**, Treinamento do Analisador Automático Hitachi 911. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

1. GENARI, M. C.; BOMFIM, F. R. C.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Participação em banca de Grazielli Sgarbiero Montanha Marchiori. A inserção do profissional farmacêutico nas práticas integrativas e complementares. 2017. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia Clínica e Atenção Farmacêutica) - Centro Universitário Herminio Ometto de Araras.
2. ALVES, A. A.; PAGANOTTE, D. M.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Participação em banca de Neuza Maria Mirando dos Santos. A dieta detox desintoxica? Aspectos toxicológicos de um novo modismo alimentar. 2017. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Toxicologia) - Centro Universitário Herminio Ometto de Araras.
3. GENARI, M. C.; CHIAROTTO, G. B.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Participação em banca de Daniela Ferraz Menezes. O uso de ensaios de genotoxicidade para avaliação de segurança de compostos. 2017. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Toxicologia) - Centro Universitário Herminio Ometto de Araras.
4. ALVES, A. A.; BOMFIM, F. R. C.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Participação em banca de Cleiton Pereira de Souza. Avaliação da fitotoxicidade das vinhaças de cana-de-açúcar e laranja por meio de testes de germinação e crescimento de raiz em sementes de alface (*Lactuca sativa*). 2017. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Toxicologia) - Centro Universitário Herminio Ometto de Araras.

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; SMELAN, J. C.; ALONSO, H. R.. Participação em banca de Caroline Vieira. Estudo da infertilidade feminina com o uso da medicina tradicional chinesa. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
2. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; SMELAN, J. C.; FIGURAVANTI, M. T.. Participação em banca de Bruna Valentina Faria Pilon e Ana Carolina de Carvalho Lopes. Hemoglobina glicada no monitoramento de paciente com diabetes mellitus. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
3. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; MENEGATI, S. F. P.; PALIMENO, A. C. S.. Participação em banca de Jenifer Santos Teixeira e Welder Ressler. Importância da interpretação dos métodos de triagem laboratoriais para diagnóstico das síndromes hematológicas. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
4. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; SMELAN, J. C.; FIGURAVANTI, M. T.. Participação em banca de Cleonice Veira da Silva e Aparecida Loureiro Caggegi. A evolução em análises clínicas. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 11º Congresso Científico FHO UNIARARAS | 8º Congresso Internacional | 10º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPq. Doenças autoimunes, endócrinas e câncer: o impacto negativo de xenobióticos no desenvolvimento da resposta imune inata. 2016. (Congresso).
2. 36th Annual Conference of the American Society for Laser Medicine and Surgery. LOW LEVEL LASER TREATMENT REDUCES OXIDATIVE STRESS INDUCED BY FORMALDEHYDE EXPOSURE BY THE MODULATION OF GENE EXPRESSION OF OXIDANT AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE LUNG. 2016. (Congresso).
3. 43º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Representando a Associação Brasileira de Biomedicina (ABBM). 2016. (Congresso).
4. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and 21th Latin American Congress of Pharmacology (LATINFARMA) A. Translocator Protein 18kDa (TSPO): A New Promising Target for Meta-Inflammation. 2016. (Congresso).
5. Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE). Participação na Comissão de Avaliação. 2016. (Feira).
6. Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE). Participação na Comissão de Pré-avaliação. 2016. (Feira).
7. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC). Investigation of the immunotoxic mechanisms of PCB-126 protein-coupled receptors activation. 2016. (Simpósio).
8. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC). Participate as evaluator of Poster Session. 2016. (Simpósio).
9. XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina. Toxicologia e Biomedicina: De que maneira o profissional Biomédico poderá contribuir positivamente e qual a importância da toxicologia para o cenário biomédico atual?. 2016. (Congresso).
10. 12th World Congress on Inflammation. TSPO GENE EXPRESSION ON 3T3-L1 DIFFERENTIATION IS MODULATED BY DIAZEPAM TREATMENT AND LPS. 2015. (Congresso).
11. 3º Congresso Brasileiro de Biomedicina Estética. Interações medicamentosas. 2015. (Congresso).
12. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9) / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia (CBTox). Avaliação de pôsteres durante o Congresso. 2015. (Congresso).
13. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9) / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia (CBTox). 2015. (Congresso).
14. 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9) / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia (CBTox). Diazepam reduces toxicity in microglia under inflammatory conditions. 2015. (Congresso).
15. Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE). Avaliação de trabalhos de jovens estudantes pré-universitários e seus professores de 27 capitais brasileiras.. 2015. (Feira).
16. Debate técnico sobre a Resolução CONTRAN n. 460. Debate técnico sobre a Resolução CONTRAN n. 460. 2014. (Encontro).
17. XIV Congresso Brasileiro de Biomedicina e II Congresso Internacional de Biomedicina. A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA BIOMÉDICA E OS BENEFÍCIOS DO USO RACIONAL DE FITOTERÁPICOS. 2014. (Congresso).

18. 44º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Achyrocline satureoides (LAM) D.C. EXTRACT TREATMENT PREVENTS NEUTROPHIL MIGRATION IN AIR POUCH MODEL. 2012. (Congresso).
19. Semana de Estudos do Curso de Biomedicina. Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Simpósio).
20. XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. ORAL ADMINISTRATION OF Achyrocline satureoides EXTRACT PREVENTS IN VIVO NEUTROPHIL MIGRATION INDUCED BY LPS. 2012. (Simpósio).
21. XXI Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli. O TRATAMENTO ORAL COM Achyrocline satureoides (Lam.) D.C., PREVINE A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS NO MODELO DE BOLSA DE AR. 2012. (Simpósio).
22. VIII Semana de Estudos do Curso de Biomedicina. Atuação Profissional em Pesquisa. 2011. (Simpósio).
23. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Study of the Action of the Serine Protease Inhibitor Amblyomin-X on Properties Adhesives and Migration of Cancer Cells Lineage SK-MEL-28. 2011. (Simpósio).
24. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Estudo da ação do inibidor de serina protease Amblyomin-X sobre as propriedades adesivas e migratórias de células cancerosas da linhagem SK-MEL-28. 2011. (Simpósio).
25. 43º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial. 2009. (Congresso).
26. 47º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial. 2008. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Ciclo de Capacitação e Aprimoramento para Biomédicos do Conselho Regional de Biomedicina - 1ª Região. 2016. (Outro).
2. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Ciclo de Capacitação e Aprimoramento para Biomédicos do Conselho Regional de Biomedicina - 1ª Região. 2016. (Outro).
3. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Ciclo de Capacitação e Aprimoramento para Biomédicos do Conselho Regional de Biomedicina - 1ª Região. 2016. (Outro).
4. COLASSO, C.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Armas Químicas: o mau uso da toxicologia. 2016. (Outro).
5. YABIKU, F. M.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Sessão Solene na Câmara dos Vereadores de Sorocaba em homenagem ao dia do Biomédico. 2016. (Outro).
6. SANTOS, A. C. A.; HASTREITER, A.; OLIVEIRA, D. C.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; TESSARO, F.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; MENDES, L.; AYALA, T. S.; SANTOS, S. S.; BONEZI, V.; BRANQUINHO, M. S. F.; ALMEIDA, S. R.; MARIA-ENGLER, S. S. . II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology and VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas. 2016. (Congresso).
7. ALVES, M. F. M.; **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Métodos e Técnicas em Biologia Molecular. 2016. (Outro).
8. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**. Ciclo de Capacitação e Aprimoramento para Biomédicos do Conselho Regional de Biomedicina - 1ª Região. 2016. (Outro).
9. **BARIONI, ÉRIC DIEGO**; SANTOS, A. C. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; HASTREITER, A.; DIAS, C. C.; OLIVEIRA, D. C.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; OLIVEIRA, S. C. W. S. E. F.; BONEZI, V.; SOARES, I. S.; ALMEIDA, S. R. . VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas & I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology. 2015. (Congresso).
10. LOUREIRO, A. P. M.; DREWES, C. C.; ELLER, S. C. W. S.; **BARIONI, E. D.**; OLIVEIRA, A. A. F.; DURAO, A. C. C. S.; RIBEIRO, A. L. T.; TORRES, L. H. L.; OLIVEIRA, T. F. . III Escola de Inverno em Toxicologia (III EITox). 2014. (Outro).
11. **BARIONI, E. D.**. VI Semana de Estudos da Faculdade de Saúde e Ciências da Vida do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2009. (Outro).
12. **BARIONI, E. D.**. IV Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biomédicas do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2007. (Outro).
13. **BARIONI, E. D.**. III Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biomédicas do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2006. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Rafaela Pereira Padilha. ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO EM PACIENTES HIPERTENSOS: UMA REVISÃO DA LITERATURA.. Início: 2017. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia Clínica e Atenção Farmacêutica) - Centro Universitário Hermínio Dmetto de Araras. (Orientador).

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Dajane Cristina da Silva Pereira Nunes. ESTUDO SOBRE A PREVALÊNCIA, CRENÇAS E ATITUDES RELACIONADAS AO USO DE NARGUILÉ EM JOVENS DE UMA ESCOLA PÚBLICA DE SOROCABA - SP.. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. (Orientador).
2. Ana Elisa Rubinato Cavalheiro. ESTUDO SOBRE A PREVALÊNCIA, CRENÇAS E ATITUDES RELACIONADAS AO USO DE NARGUILÉ EM JOVENS DE UMA ESCOLA PÚBLICA DE SOROCABA - SP.. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. (Orientador).
3. Talita Ferreira do Nascimento. AVALIAÇÃO DO RISCO DE INTOXICAÇÕES POR DOMISSANITÁRIOS NA POPULAÇÃO DO BAIRRO PARQUE SÃO CAMILO EM ITU - SP. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. (Orientador).
- 4.

- Jessika Souza R. Gomes. DROGAS FACILITADORAS DE CRIME. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Nove de Julho. (Orientador).
5. Elisângela Pinheiro Cunha. ALTERAÇÕES ORGÂNICAS PROVOCADAS PELO USO DA MACONHA E O IMPACTO DESTES USOS NO DESENVOLVIMENTO ESCOLAR/SOCIAL DE JOVENS E ADOLESCENTES. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Nove de Julho. (Orientador).
 6. Gabriela Doany Santana de Almeida Ferriera. LEVANTAMENTO DE ESTUDOS SOBRE A TOXICIDADE DE NANOMATERIAIS PRESENTES EM FILTRO SOLAR. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Nove de Julho. (Orientador).
 7. Luana Cardoso de Araújo. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS INDUTORES DA DEPENDÊNCIA AO ETANOL. Início: 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Nove de Julho. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Camila Anacleto Pedro Bom. A assistência farmacêutica no manejo de pacientes portadores de Diabetes Mellitus 1: uma revisão da literatura.. 2017. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Farmacologia Clínica e Atenção Farmacêutica) - Centro Universitário Hermínio Ometto de Araras. Orientador: Eric Diego Barioni.

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. **BARIONI, E. D.**. Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Outras informações relevantes

Eric Diego Barioni foi tesoureiro da III Escola de Inverno em Toxicologia (2014), do VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC) e I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology (2015), e atualmente é tesoureiro do VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC) e II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology (2016).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 30/10/2017 às 22:12:32

Imprimir currículo

ANEXO 3 – FICHA DO ALUNO ATUALIZADA

30/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7749620/2 - Éric Diego Barioni

Email: ebarioni@usp.br
Data de Nascimento: 05/08/1986
Cédula de Identidade: RG - 33.953.965-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio - São Paulo - Brasil - 2010
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 03/07/2013
Início da Contagem de Prazo: 03/07/2013
Data Limite para o Depósito: 31/10/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 03/07/2013 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/07/2013
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 03/07/2017 até 31/10/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 22/09/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/07/2013
 Prorrogação em 28/06/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 21:59:46

30/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7749620/2 - Éric Diego Barioni

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5746-3/1	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	05/08/2013	15/09/2013	120	8	100	A	N	Concluída
BMF5869-2/1	Processo Inflamatório em Doenças Cardiovasculares e Metabólicas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/09/2013	05/11/2013	90	6	90	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0522 - Fisiologia do Sistema Hematopoético, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (1)	01/02/2014	30/06/2014	-	3	-	-	-	-
FBC5722-2/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/09/2014	22/09/2014	60	4	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	21
Estágios:			
Total:	10	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 02/10/2014.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 21:59:46

30/10/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Documento sem validade oficial****FICHA DO ALUNO**

9141 - 7749620/2 - Éric Diego Barioni

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
1618543	Maurício Yonamine	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 30/10/2017 21:59:46