



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**O PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 E CASPASE  
1/11 NA MODULAÇÃO DA ADIPOGÊNESE,  
INFLAMAÇÃO E MICROBIOTA**

Brasília – DF  
Outubro, 2017

Universidade de Brasília – UnB  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

# **O PAPEL DO INFLAMASSOMA NLRP3 E CASPASE 1/11 NA MODULAÇÃO DA ADIPOGÊNESE, INFLAMAÇÃO E MICROBIOTA**

LÍVIA PIMENTEL DE SANT'ANA DOURADO

Tese apresentada à Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutora pelo Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Molecular.

Área de Concentração: Imunologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace  
Magalhães

Brasília – DF  
Outubro, 2017

**Lívia Pimentel de Sant'Ana Dourado**

**O papel do inflamassoma NLRP3 e Caspase 1/11 na modulação da adipogênese, inflamação e microbiota**

**Data: 20 de Outubro de 2017**

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)  
Universidade de Brasília – UnB

---

Dario Simões Zamboni (Membro Titular)  
Universidade de São Paulo - USP

---

Andreza Fabro de Bem (Membro Titular)  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

---

Rinaldo Wellerson Pereira (Membro Titular)  
Universidade Católica de Brasília - UCB

---

Nathalia Marcolini Pelucio Pizato (Membro Suplente)  
Universidade de Brasília – UnB

## **Agradecimentos**

Ao meu pai Ayrà, que sempre está comigo, torna tudo na minha vida possível e que nunca me deixa faltar caminhos para trilhar.

À Michelle, minha esposa, por ser tão companheira e sempre me ajudar em tudo que pode, muitas vezes sendo altruísta, e estando ao meu lado nos dias bons e ruins.

À minha orientadora, Kelly, que sempre é paciente e me fez/faz crescer enquanto pessoa e cientista, sendo um grande exemplo para mim.

À minha mãe, a pessoa mais fabulosa desse mundo, que nunca me deixou faltar nada e se desdobra para me atender sempre que preciso.

Às minhas famílias – de sangue, de santo e da vida – por toda a compreensão e apoio, por cada “eu me orgulho de você” que me foi falado, por todos os convites que me foram feitos mesmo após tantos previamente negados, por cada palavra de apoio e por toda admiração que tem, e demonstram, por mim.

Aos meu colegas de trabalho, família LIMI, meu obrigada pela convivência diária, pelas conversas que tornaram meu dia mais feliz, pelas discussões científicas tão enriquecedoras, pelas madrugadas e feriados compartilhados.

Agradeço também a todos que duvidaram e/ou não acreditaram em mim, isso também foi um incentivo para seguir sempre em frente, mesmo nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todos que estiveram comigo nessa caminhada.



“Ibẹ̀rè ki ikeji eni ko sina; enitti ko  
lé bẹ̀re, ni npón ara rè loju.”

“As perguntas livram os homens  
dos erros; aquele que não  
pergunta entrega-se aos  
problemas”

Mãe Stella de Oxóssi

## Resumo

A obesidade é uma doença reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1997. Devido a vários fatores (genéticos, ambientais, dietéticos), esta doença atualmente é uma grande parte da população mundial e está associada a várias outras patogenicidades. Vários estudos mostraram que quantidades maiores de gordura corporal estão associadas a riscos aumentados de vários tipos de câncer. A inflamação está relacionada à obesidade e ao câncer. Os mediadores pró-inflamatórios causam efeitos locais e sistêmicos. O inflamassoma NLRP3, um importante complexo proteico para o processo inflamatório, é responsável pela maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. A ausência de componentes da inflamação já foi relacionada a um aumento de peso aumentado. Outro fator intimamente relacionado com obesidade, inflamação e, conseqüentemente, câncer é a microbiota. A filogenia e os metabólitos da microbiota intestinal podem desempenhar um papel benéfico e protetor ou nocivo, sendo relacionados ao desenvolvimento de doenças no hospedeiro. Ainda, existem dois tipos de adipócitos presentes no corpo – branco (WAT), amplamente distribuído e mais conhecido por seu papel no armazenamento de gordura, e marrom (BAT), localizados em depósitos específicos e com papel termogênico – têm papéis distintos na modulação do metabolismo e da resposta imune. O presente estudo avaliou o papel do inflamassoma NLRP3 no perfil inflamatório, metabolismo lipídico e na modulação da microbiota intestinal de animais obesos. Também foi avaliado se a abundância de WAT e BAT é modificada com a depleção dos componentes do inflamassoma e a ativação de macrófagos induzida por esses tecidos e o papel do inflamassoma nessa ativação. Para a primeira parte, camundongos selvagens e deficientes para caspase 1/11 e NLRP3 do inflamassoma foram alimentados com dieta convencional e rica em lipídeos (45% de calorias advindas de lipídeos) por 90 dias, a resposta inflamatória, o metabolismo de lipídeos e a filogenia da microbiota intestinal foram analisados. Nossos dados sugerem que animais nocautes para caspase1/11 apresentaram maior suscetibilidade à obesidade, com conseqüentes alterações dos marcadores de metabolismo lipídico e inflamatórios (esteatose hepática, biogênese de corpúsculos lipídicos, secreção de IL-12 e CD1d em células do lavado peritoneal), mudanças metabólicas no perfil lipídico global do fígado e alteração na abundância filogenética da microbiota intestinal, apresentando filós envolvidos com ganho de peso e esteatose hepática; indicando uma modulação imunológica e no metabolismo lipídico. Na segunda parte, WAT e BAT foram retirados de animais selvagens e depletados para componentes de inflamassoma, mantidos em meio de cultura e o sobrenadante foi usado para estimular macrófagos de medula óssea (BMDM). Os animais nocautes apresentaram uma distribuição distinta desses tecidos e o uso do sobrenadante WAT e BAT depletados para proteínas do inflamassoma NLRP3 sugere que este complexo desempenha um papel importante na ativação de macrófagos regulada pelo tecido adiposo. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a ausência de caspase 1/11 modulam a abundância de WAT e BAT, que possuem papéis diferenciados na ativação de células imunes e, ainda, que a obesidade induzida pela dieta rica em gordura e a ausência de caspase 1/11 podem regular o metabolismo lipídico, a resposta inflamatória e a composição da microbiota intestinal.

## Abstract

Obesity is a disease recognized by the World Health Organization (WHO) since 1997. Due to several factors (genetic, environmental, dietary), this disease is currently a large part of the world population and is associated with several other pathogenicities. Several studies have shown that higher amounts of body fat are associated with increased risks of various types of cancer. Inflammation is related to obesity and cancer. Pro-inflammatory mediators cause local and systemic effects. The inflammasome NLRP3, an important protein complex for the inflammatory process, is responsible for the maturation of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. The absence of components of the inflammasome has already been related to an increased weight gain. Another factor closely related to obesity, inflammation and, consequently, cancer is the microbiota. The phylogeny and metabolites of the gut microbiota may play a beneficial and protective or deleterious role, being related to the development of diseases in the host. Furthermore, there are two types of adipocytes present in the body - white (WAT), widely distributed and better known for their role in fat storage, and brown (BAT), located in specific deposits and with thermogenic paper - have distinct roles in modulating metabolism and immune response. The present study evaluated the role of NLRP3 inflammation in the inflammatory profile, lipid metabolism and modulation of the intestinal microbiota of obese animals. It was also evaluated whether the abundance of WAT and BAT is modified by the depletion of the components of the inflammasome and the activation of macrophages induced by these tissues and the role of the inflammasome in this activation. For the first part, wild-type and caspase-deficient mice 1/11 and NLRP3 of the inflammasome were fed with a conventional diet and rich in lipids (45% of calories from lipids) for 90 days, the inflammatory response, lipid metabolism and phylogeny of the intestinal microbiota were analyzed. Our data suggest that animal knockouts for caspase 1/11 were more susceptible to obesity, with consequent changes in the markers of lipid and inflammatory metabolism (hepatic steatosis, biogenesis of lipid bodies, IL-12 and CD1d secretion in peritoneal lavage cells), changes metabolomics in the global lipid profile of the liver and alteration in the phylogenetic abundance of the intestinal microbiota, presenting phyla involved with weight gain and hepatic steatosis; indicating immunological modulation and lipid metabolism. In the second part, WAT and BAT were taken from wild animals and depleted for inflammasome components, kept in culture medium and the supernatant was used to stimulate bone marrow derived macrophages (BMDM). The knockout animals showed a distinct distribution of these tissues and the use of the supernatant WAT and BAT depleted for proteins of the NLRP3 inflammasome suggests that this complex plays an important role in the activation of macrophages regulated by adipose tissue. Taken together, our results suggest that the absence of caspase 1/11 modulate the abundance of WAT and BAT, which have differentiated roles in the activation of immune cells and also that obesity induced by the high fat diet and the absence of caspase 1/11 can regulate lipid metabolism, inflammatory response and intestinal microbiota composition.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	10
1.1. A obesidade.....	10
1.2. Tecido adiposo.....	10
1.3. Obesidade e inflamação.....	11
1.4. Obesidade e microbiota.....	14
<b>2. Justificativa</b> .....	18
<b>3. Objetivos</b> .....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	20
4.1. Camundongos, tratamentos <i>in vivo</i> e considerações éticas.....	20
4.2. Aquisição de células do lavado peritoneal.....	20
4.3. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo.....	21
4.4. Análise de ativação celular através da expressão de CD1d.....	21
4.5. Análise da geração de espécies reativas de Oxigênio (ROS).....	21
4.6. Análise de produção de Óxido Nítrico (NO).....	22
4.7. Dosagem de citocinas.....	22
4.8. Análise da microbiota intestinal.....	23
4.8.1. Isolamento de DNA de amostras fecais.....	23
4.8.2. Amplificação do DNAr 16s por PCR.....	24
4.8.3. Sequenciamento por Illumina (V4).....	24
4.8.4. Análise filogenética.....	24
4.9. Lipidômica feita por MALDI-TOF.....	24
4.9.1. Preparação de amostra e extração de lipídios.....	25
4.9.2. Análise MALDI-MS.....	25
4.9.3. Análise multivariada de dados MALDI-MS.....	25
4.10. Extração de tecidos adiposos branco e marrom.....	26
4.11. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).....	26
4.12. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por <i>Oil Red</i> .....	26
4.13. Análise estatística.....	26
<b>5. Resultados</b> .....	27
5.1. Experimentos <i>in vivo</i> .....	27
5.1.1. A ausência das caspases 1 e 11 favorece o ganho de peso em animais submetidos a dieta hiperlipídica.....	27

5.1.2. A ausência das caspases 1 e 11 favorece a síndrome metabólica, com aumento de órgãos e esteatose, em animais submetidos a dieta hiperlipídica.....	31
5.1.3. A dieta hiperlipídica intensifica a modulação da composição global lipídica do fígado pelo inflamassoma NLRP3 e caspase -1/11.....	35
5.1.4. A ausência das caspases 1 e 11 leva a uma maior biogênese de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal .....	39
5.1.5. A ausência das caspases 1 e 11 favorece o aumento de moléculas apresentadoras de antígenos lipídicos, que é independente da obesidade.....	40
5.1.6. A ausência da proteína NLRP3 favorece o aumento do estresse oxidativo.....	41
5.1.7. A ausência das caspases 1 e 11 modula a secreção de IL-12 em animais submetidos à dieta hiperlipídica.....	43
5.1.8. O inflamassoma NLRP3 participa da modulação da microbiota pela obesidade.....	44
5.2. Experimentos <i>ex vivo</i> .....	51
5.2.1. O inflamassoma NLRP3 modula a abundância dos tecidos adiposos.....	51
5.2.2. O papel diferencial de adipócitos marrons e brancos na ativação de macrófagos.....	52
<b>6. Discussão</b> .....	<b>57</b>
<b>7. Conclusão</b> .....	<b>62</b>
<b>8. Referências bibliográfica</b> .....	<b>64</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>74</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 A Obesidade**

A obesidade é uma doença reconhecida pela OMS (Organização Mundial da Saúde) desde 1997 e em 2002 foi definida pela mesma organização como um excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo com implicações para a saúde. Decorrente de diversos fatores (genéticos, ambientais, dietéticos, sedentarismo ou ainda susceptibilidades biológicas individuais), essa doença atinge atualmente uma grande parcela da população mundial. Trata-se de uma condição complexa de dimensões sociais, biológicas e psicossociais consideráveis, afetando pessoas de todas as idades e de todos os grupos socioeconômicos.

Considerada a epidemia do séc. XXI, a obesidade teve um aumento de mais de 100% desde 1980 em todo o mundo. Os dados da OMS revelam que em 2014 quase 2 bilhões de adultos, 39%, tinham sobrepeso (IMC > 25) e mais de 600 milhões, 13%, eram obesos (IMC > 30); em 2013 mais de 42 milhões de crianças menores que cinco anos tinham sobrepeso. A projeção para 2025 é que o número de adultos com sobrepeso seja de 2,3 bilhões e de obesos seja mais de 700 milhões, o número de crianças acima do peso (sobrepeso e obesidade) poderá chegar a 75 milhões (1). Segundo o documento da Organização Mundial de Saúde, o sobrepeso em adultos no Brasil em 2014 era de 54,1% e a obesidade de 20%, sendo a maior prevalência entre as mulheres, 22,7% (2).

Uma grande preocupação médica é o risco elevado de doenças associadas ao sobrepeso e à obesidade, tais como diabetes, doenças cardiovasculares (DCV) e alguns cânceres. Vários estudos têm demonstrado que a obesidade está fortemente associada a um risco maior de desfechos, sejam cardiovasculares, câncer ou mortalidade. No estudo *National Health and Nutrition Examination Study III* (NHANES III), que envolveu mais de 16 mil participantes, a obesidade foi associada a um aumento da prevalência de diabetes tipo 2 (DM2), doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana (DAC), hipertensão arterial sistêmica (HAS), osteoartrose (OA) e de dislipidemia (3). Há também evidências consistentes de que quantidades maiores de gordura corporal estão associadas a riscos aumentados de vários tipos de câncer (4).

### **1.2 Tecido adiposo**

Bem como os macrófagos, os adipócitos também podem se apresentar de duas maneiras bem distintas, modificando completamente a modulação do metabolismo e da resposta imune. Primeiro, e mais abundante, localizado principalmente em regiões subcutâneas e intra-abdominais, o tecido adiposo branco (WAT) é considerado o

armazenamento de energia e é responsável por regular o balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise (5), adicionalmente, no tecido adiposo branco também é encontrada uma população de macrófagos. A abundância desses macrófagos residentes está diretamente relacionada com o grau de inflamação do tecido em condições de obesidade. Segundo, encontrado em determinados locais do corpo, o tecido adiposo marrom (BAT) apresenta função termogênica, é mais vascularizado, possui maior número de mitocôndrias, encontra-se em maior porcentagem no corpo ao nascer e vai decaindo com a idade (6,7). Essas mitocôndrias presentes no BAT são altamente oxidativas, por conta da proteína-1 de desacoplamento (UCP1) que desacopla a cadeia respiratória, e oxidam os substratos metabólicos, dissipando a energia química na forma de calor (8).

Desde a última década, o tecido adiposo é reconhecido como um importante órgão endócrino metabolicamente ativo (9). Tanto o tecido adiposo branco quanto o marrom são responsáveis pela secreção de diversas substâncias que podem ter ação local ou sistêmica e participam da regulação de vários processos e patologias metabólicas. Essas substâncias são conhecidas como adipocinas, sendo elas: adiponectina, leptina, resistina e visfatina, onde as duas primeiras são as mais abundantes (Wellen et al. 2005). Adipocinas estabelecem um importante *link* entre o tecido adiposo, condições de obesidade e desordens inflamatórias, especula-se que adipocinas possam ser um dos pontos de conexão entre obesidade e câncer (Tilg & Moschen 2006). Em modelos animais, já foi encontrado que a adiponectina inibe o crescimento primário do tumor de forma dependente de caspases, levando a apoptose de células endoteliais (Bråkenhielm, Ebba, et al. 2004). Em linhagens tumorais (câncer de mama, próstata, ovário, pulmão e cólon) foi verificada ação da leptina como um indutor da proliferação enquanto adiponectina atuaria diminuindo essa proliferação (Garofalo et al. 2006). Além das adipocinas clássicas o tecido adiposo também secreta outros fatores imunomoduladores como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6), IL-1, IL-18, proteína quimiotática de macrófagos (MCP1), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e certos fatores do complemento e crescimento os quais também podem ser classificados como adipocinas (Ouchi et al. 2011; Tilg & Moschen 2006).

### **1.3 Obesidade e inflamação**

Cada vez mais tem-se voltado atenção para as consequências da inflamação no tecido adiposo local. Macrófagos de tecido adiposo podem compreender até 40% das células no tecido adiposo obesos e representam uma fonte rica de citocinas (10). Focos

inflamatórios caracterizados por *crown-like structures* (CLS), que consistem em adipócitos mortos cercados por macrófagos (11), inicialmente foram identificados na gordura visceral e subcutânea, e mais recentemente foram observados em tecido adiposo branco da mama de mulheres e ratas obesas, onde foram chamados CLS-B, "B" de *breast*, denotando mama (12,13).

A formação de CLS fornece aos macrófagos uma estrutura funcional na morte dos adipócitos, mas também resulta numa exposição desses macrófagos aos ácidos graxos saturados advindos da lipólise associada à obesidade (14). Como consequência, há a indução da ativação dos macrófagos, via *Toll-like receptor 4* (TLR4), estimulando assim a sinalização de NF- $\kappa$ B. Este, por sua vez, ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo ciclo-oxigenase-2 (COX2), IL-6, IL-1 $\beta$ , e factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (15,16).

Os macrófagos podem ser divididos em duas classes funcionais, M1, também referidos como classicamente ativados, e M2 ou alternativamente ativados. Embora simplista, esta classificação binária de macrófagos quanto a sua polarização tem se mostrado útil para a compreensão da relação entre a inflamação e biologia do câncer. Macrófagos M1 secretam mediadores pró-inflamatórios incluindo prostaglandina E2 (PGE2), IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , enquanto os macrófagos M2, induzidos por citocinas Th2, são distintos e funcionalmente associados à remodelação de tecidos e imunossupressão. Macrófagos residentes nos tecidos adiposo de pessoas eutróficas tendem a ser M2, enquanto que em pessoas com sobrepeso ou obesas tendem a ser M1, desta forma, sugere-se que os macrófagos M1 desempenham um papel importante na inflamação do tecido adiposo na obesidade (17).

Os níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios causam efeitos locais e sistêmicos. No que diz respeito ao câncer de mama, o aumento de COX2 e PGE2 levam a um aumento da transcrição do gene que codifica a aromatase CYP19, a enzima limitante da velocidade para a síntese de estrógeno (18). Notavelmente, este eixo aromatase-obesidade-inflamação fornece uma explicação plausível para o aumento das taxas de câncer de mama positivos para receptores hormonais pós-menopausa associados à obesidade (13,19).

O inflamassoma é composto por PRRs citosólicos do tipo NLRs que são um grupo protéico e em humanos é codificado por 22 genes e possui a divisão em três subfamílias: NOD, NLRP e IPAF (ou NLRC) (20). Esses são constituídos por três regiões funcionais: a primeira é uma região NOD de regulação localizada na posição central; a segunda é uma região N-terminal efetor envolvida na sinalização, nesse domínio podem ter um domínio



(PYD), um domínio para recrutamento de caspase (CARD) ou um domínio inibidor de baculovírus (BIR); e a terceira região é a C-terminal que é composta por repetições ricas em leucina (21). A montagem desse complexo ocorre de forma que a proteína NLR recruta uma proteína adaptadora, como a ASC, que interage com a caspase-1 ou caspase-11 levando a sua ativação, promovendo a maturação das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e IL-18 (22).

Em recente estudo, a ausência Caspase-1 foi associada à obesidade; tal associação é dependente de idade e sexo, sendo positiva ao sexo masculino e à uma idade mais avançada (23). A Caspase-1 também está relacionada à diferenciação dos adipócitos e à resistência à insulina; ela é positivamente regulada durante a diferenciação e direciona os adipócitos a um fenótipo mais resistente à insulina, sua atividade, bem como da IL-1 $\beta$ , também é aumentada na obesidade. Animais deficientes em Caspase-1 ou NLRP3 resultam em adipócitos metabolicamente mais ativos e, nos deficientes em Caspase-1, também foi apresentada uma maior sensibilidade à insulina, além de uma alta taxa de oxidação lipídica (24).

A citocina IL-1 $\beta$  participa em diversos processos metabólicos importantes e a sua produção e secreção requerem dois sinais celulares. O primeiro ocorre por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais levam a ativação de uma cascata de sinalização que culmina na translocação do fator transcrição do NF- $\kappa$ B para o núcleo, o que induz a transcrição da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. O segundo sinal leva ao processamento proteolítico destes precursores, pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, em suas formas biologicamente ativas via caspase-1, processo que exige a ativação de um complexo multiprotéico intracelular denominado inflamassoma.

A IL-1 $\beta$  também age na sensibilidade à insulina, induzindo a diferenciação de adipócitos para um fenótipo mais resistente à insulina, de maneira dependente da ativação da caspase-1; *in vivo*, animais obesos, induzido por dieta ou por modificações genéticas, apresentaram um aumento da ativação de caspase-1 e da secreção de IL-1 $\beta$  no tecido adiposo (24). Desta forma, a resistência à insulina também é induzida por inflamação crônica (25).

A resistência à insulina resulta em perturbações metabólicas generalizadas com efeito na acumulação de triglicerídeos no fígado, a crescente prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é paralela ao aumento da obesidade e suas complicações. A composição dietética, a susceptibilidade genética e os hábitos de exercício influenciam o desenvolvimento de NAFLD (26).

A apresentação da doença hepática varia desde a esteatose até a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) (27). NAFLD é uma manifestação hepática da síndrome metabólica que inclui obesidade abdominal central juntamente com outros componentes. Até 80% dos pacientes com NAFLD são obesos (28); a esteatose hepática esta relacionada com IMC, mas principalmente esta associada ao tecido adiposo visceral (29).

Os ácidos graxos livres, derivados do tecido adiposo visceral, das fontes dietéticas e da lipogênese, são liberados para o sistema circulatório, juntamente com a inflamação crônica de baixo grau do tecido adiposo visceral, são considerados dois dos fatores mais importantes que contribuem para a progressão da lesão hepática em NAFLD (30). Além disso, a secreção de adipocinas do tecido adiposo visceral, bem como a acumulação de lipídeos no fígado, promove a inflamação através das vias de sinalização do NF- $\kappa$ B, que também são ativadas por ácidos graxos livres e contribuem para a resistência à insulina (31). Além da resistência à insulina e à obesidade, a NAFLD também está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doença renal crônica, complicações pós-operatórias após maior cirurgia hepática e câncer colorretal (32).

#### **1.4 Obesidade e microbiota**

Vários mecanismos acerca de como os adipócitos favorecem a carcinogênese, bem como o papel da inflamação neste processo ainda permanece desconhecido. Um fator importante para clarificação dessa relação é a microbiota, que destaca-se por estar relacionada a diversos processos inflamatórios e fatores fisiológicos, tais como alergias, asma, câncer, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (33,34); trata-se de uma comunidade complexa de microorganismos, que incluem principalmente bactérias, e proporciona uma enorme capacidade enzimática que desempenha um papel fundamental no controle de muitos aspectos da fisiologia do hospedeiro (35).

Ao longo dos últimos anos, o campo da imunologia tem sido revolucionada pela crescente compreensão do papel fundamental da microbiota na indução e função do sistema imunitário dos mamíferos. As comunidades microbianas, os seus metabolitos e componentes não só são necessários para a homeostase imunológica, mas também influenciam a susceptibilidade do hospedeiro para muitas doenças imuno-mediadas e outros transtornos. A microbiota fornece pistas moleculares cruciais, por meio de antígenos de superfície e metabolitos, que são essenciais para a maturação dos tecidos imunes e para o ajuste fino das respostas imunes (36).

Cada região do corpo é espacialmente distinta e diferencialmente dominada por

filos específicos (37). No intestino, a quantidade e diversidade de espécies microbianas aumenta longitudinalmente a partir do estômago para o cólon (38,39), sendo no cólon a microbiota mais densa e metabolicamente mais ativa (40). Uma vez que o microbioma de cada órgão é distinto, variando em diversidade e a abundância, sugere-se que os efeitos na inflamação e na carcinogênese provavelmente serão específicos de cada órgão. Além disso, existe uma variabilidade interindividual importante e funcionalmente relevante de microbiomas, o que os torna um potencial determinante do desenvolvimento de doenças, incluindo câncer (37). Essas diferenças da comunidade bacteriana podem ser uma explicação para a ocorrência de doenças em locais específicos dentro de um órgão; por exemplo, a maior taxa de câncer no intestino grosso - onde as densidades microbianas são muito maiores do que no intestino delgado (41). Embora muitos órgãos, por exemplo, o fígado, não contenham um microbioma conhecido, eles podem estar expostos a padrões moleculares associados a microorganismos (PAMPs) e metabolitos bacterianos que circulam sistemicamente (42–45).

Estudos em animais estéreis revelaram efeitos da microbiota pró tumorigênicos em cânceres espontâneos, incluindo cânceres pele, cólon, fígado, mama e pulmões (46). Da mesma forma, o esgotamento da microbiota bacteriana intestinal em camundongos, usando antibióticos, reduz o desenvolvimento de câncer no fígado (44,45) e cólon (47,48). Embora a maioria desses estudos mostre os efeitos da microbiota pró-tumorigênicos, também foram observados efeitos antitumorais. Estudos associaram componentes bacterianos específicos, agonistas do receptor Toll-like (TLR) e do receptor tipo NOD (NLR), como responsáveis por efeitos antitumorais, levando ao conceito de que a ativação potente da imunidade inata pode converter a tolerância tumoral em respostas imunes antitumorais (49,50).

No entanto, raramente a microbiota bacteriana desencadeia o grau de ativação imune inata que é necessário para respostas imunes antitumorais e, em vez disso, muitas vezes induz a inflamação crônica de baixa intensidade que promove a doença. De fato, há evidências crescentes de pacientes e modelos animais que mostram efeitos relevantes da microbiota para a promoção do cânceres em muitos órgãos, particularmente aqueles que estão expostos à microbiota ou a MAMPs (46).

A alimentação é capaz de modificar rapidamente a composição da microbiota e, conseqüentemente, os metabólitos produzidos. A dieta ocidental, com seu alto teor de gordura e alto teor de açúcar, afeta a constituição e o ambiente intestinal do hospedeiro (51) e conseqüentemente a população de microorganismos que ali habitam. Sendo assim, a distribuição microbiana no intestino pode ser alterada pela dieta, sugerindo que a

regulação dietética da microbiota intestinal pode ser importante para o gerenciamento de doenças metabólicas induzidas pela inflamação. A partir do metabolismo desses microorganismo, inúmeras moléculas são produzidas e lançadas no organismo do hospedeiro, podendo essas moléculas serem benéficas ou malélicas, a depender do perfil filogenético das bactérias.

A microbiota pode ter um efeito anti-inflamatorio no corpo; ela produz vários ácidos graxos específicos, muitos que não podem ser ingeridos na alimentação, a partir de ácidos graxos poli-insaturados, via metabolismo da saturação (52). Entre estes ácidos graxos específicos, o ácido linoleico conjugado é relatado como tendo um efeito protetor nas articulações em artrite relacionada à inflamação (53). Além disso, o ácido 10-hidroxi-cis-12-octadecenoico suprime o comprometimento da barreira intestinal induzido por TNF- $\alpha$  em células Caco-2 e a colite intestinal induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos (54). Vários destes ácidos graxos, metabolizados a partir de gordura alimentar, podem ser detectados no sangue e nos órgãos (52) mostrando a atuação sistêmica dessas moléculas produzidas pela microbiota. Recente estudo mostrou que a enona dos ácidos graxos, metabólitos da microbiota intestinal, têm um efeito anti-inflamatorio potente em macrófagos estimulados por LPS e adipócitos hipertrofiados através da repressão de fatores pró-inflamatórios que levam à melhora das disfunções induzidas pela inflamação em adipócitos (55).

Da mesma maneira, uma vez em disbiose, a microbiota pode gerar inflamação. A endotoxemia metabólica, caracterizada pela concentração plasmática de LPS duas a três vezes maior em decorrência à dieta hiperlipídica (56), mostrou ser o principal contribuinte para a patogenicidade da inflamação crônica de baixo grau, acredita-se que esse alto nível de LPS plasmático é originário de bactérias gram-negativas intestinais que se espalham sistemicamente através da circulação, como resultado direto da disfunção da barreira intestinal (57). A ligação de LPS com TLR4 leva ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (58). A dieta é o fator mais importante que determina a composição da microbiota intestinal. A alteração da microbiota e a resultante desintegração da barreira intestinal, promovidas pela obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, são fatores-chave que facilitam a endotoxemia metabólica (57,58).

Mudanças na permeabilidade intestinal, endotoxemia e interações com ácidos biliares, podem contribuir para o desenvolvimento de esteatose hepática não alcóolica (59). Especificamente, uma microbiota disbiótica é freqüentemente observada entre indivíduos obesos (60) e está associada a uma maior proporção de bactérias Gram-negativas na microbiota intestinal, que por sua vez está associada ao NAFLD (61).

Dessa forma, evidências que ligam a microbiota intestinal e o metabolismo do indivíduo podem permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com base na modulação da microbiota intestinal para prevenir ou retardar a progressão de algumas patologias.

## **2. Justificativa**

Está cada vez mais claro que a microbiota, a inflamação e a obesidade estão intimamente relacionadas. Apesar de já estabelecida a relação da microbiota, do tecido adiposo e da inflamação, bem como a importância de citocinas e mediadores pró-inflamatórios secretados no estabelecimento de determinadas patologias, os mecanismos moleculares que controlam essa interação ainda não foram completamente elucidados.

O presente estudo propõe desvendar mecanismos dessa interação e estabelecer associações entre os tecidos e órgãos envolvidos, a forma de ativação de células relacionadas com o processo inflamatório, as moléculas liberadas de forma sistêmica e a relação do inflamassoma NLRP3 nesse processo.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Analisar a relação do inflamassoma NLRP3 na modulação da adipogênese, inflamação e microbiota

#### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1 - Caracterizar o papel das proteínas do inflamassoma NLRP3 (NLRP3, Caspases 1 e 11, Asc) em animais submetidos à dieta hiperlipídica ou normolipídica, analisando:

- O ganho de peso, glicemia, peso dos órgãos, perfil histopatológico do fígado
- A biogênese de corpúsculos lipídicos
- A ativação de moléculas apresentadoras de antígenos
- A geração de ROS e NO
- O perfil de secreção de citocinas

3.2.2 – Analisar o papel do inflamassoma NLRP3 e da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica sobre a composição da microbiota intestinal.

3.2.3 – Avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 e da obesidade na composição lipídica de fígados de animais tratados com dieta hiperlipídica.

3.2.4 – Analisar o papel do inflamassoma NLRP3 na dispersão de tecidos adiposos branco e marrom

3.2.5 – Verificar o papel do inflamassoma NLRP3 e dos diferentes tipos de adipócitos na ativação de macrófagos.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Camundongos, tratamentos *in vivo* e considerações éticas

Foram utilizadas fêmeas de 8 semanas, da linhagem C57/BL6 selvagens e deficientes para as proteínas Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>, no primeiro experimento, Caspase 11<sup>-/-</sup> e Asc<sup>-/-</sup>, no segundo experimento, condicionadas em ambiente livre de patógenos, em microisoladores ventiladas, com água e alimento *ad libitum*, sob ciclo de luz e escuridão de 12/12h e temperatura controlada (23 ± 2°C). Dezesesseis animais de cada genótipo foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (n = 8) e tratados por 3 meses com uma das seguintes dietas: dieta normolipídica AIN-93M ou *standard fat diet* (SFD) (62), dieta hiperlipídica AIN-93M com 45% de lipídeos ou *high fat diet* (HFD), tabelas nutricionais das dietas anexo (Anexo I). O peso dos animais era aferido semanalmente para acompanhamento da curva de ganho de peso. Os animais tiveram uma semana de aclimação e, durante todo o experimento, foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Após o período de tratamento, os camundongos foram anestesiados com 30µl de quetamina e xilasina em proporções iguais, administrados intramuscularmente. O sangue foi coletado via o globo ocular, para extração do soro e dosagem de glicemia, e posteriormente esses animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, para a retirada das células do lavado peritoneal e órgãos. Conforme protocolos detalhados a seguir, no soro, foram dosadas citocinas por ELISA e óxido nítrico por Griess; foi feita a marcação de CD1d, quantificação de geração de ROS e biogênese de corpúsculo lipídico (CL) nas células do lavado peritoneal. Os fígados foram divididos, a menor porção foi congelada em nitrogênio líquido para estudo da lipidômica e com a maior porção foi feita histologia para avaliação morfológica do órgão. As fezes dos animais foram coletadas no início e no final do tratamento e armazenadas a -80°C para estudo da microbiota.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc n° 52306/2014 (Anexo II).

### 4.2. Aquisição de células do lavado peritoneal

As células peritoneais foram adquiridas por meio de lavado da cavidade peritoneal. Brevemente, a lavagem foi realizada injetando 3mL de DMEM refrigerado dentro do peritônio. O meio foi recolhido, centrifugado a 300G por 5min. a 4°C e as células ressuspensas para uso. Para a obtenção de macrófagos peritoneais: as células do lavado peritoneal foram contadas e plaqueadas. Após 24h em estufa úmida a 37°C a 5%



CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado e as células fortemente aderidas consideradas macrófagos.

#### **4.3. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo**

Para analisar e quantificar a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) foi utilizado uma sonda fluorescente lipofílica, BODIPY 493/503 (Life technologies), usada para a identificação de lipídios neutros intracelulares (triglicerídeos e ésteres de colesterol) presentes em grandes quantidades em CLs.

Para a quantificação de CL, as células foram incubadas com uma solução de bodipy/PBS1x na concentração de 1/5000 por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após esse período as mesmas foram lavadas com PBS1x 3 vezes, ressuspensas em 500µL de paraformaldeído 1% e mantidas a 4°C até leitura por citometria de fluxo (FACS Calibur) no canal FL1 em escala logarítmica. O *gate*, quando aplicado, foi plotado na população de células viáveis, excluindo-se os restos celulares da análise. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Experimento feito em triplicata biológica.

#### **4.4. Análise de ativação celular através da expressão de CD1d**

As moléculas apresentadoras de antígeno CD1d (antígeno lipídico) ativam linfócitos T com o auxílio da molécula CD40, que também induz a produção de citocinas. As análises das moléculas de superfície CD1d foram feitas através de imunomarcação com anticorpos conjugados a moléculas fluorescentes (PE) para citometria de fluxo (Ebioscience).

Para essa análise, células peritoneais do experimento *in vivo* foram marcadas para a molécula.

As amostras foram mantidas a 4°C até leitura por citometria de fluxo (FACS Calibur) no canal FL2 em escala logarítmica. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

#### **4.5. Análise da geração de espécies reativas de Oxigênio (ROS)**

Para análise da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi utilizada a sonda 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DFC-DA) a qual é permeável à membrana celular e não é fluorescente. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, a 2',7' – diclorofluoresceína (DFC), que permanece no interior da célula.

As células do lavado peritoneais ou de cultura celular, após tratamento, foram

incubadas a 37°C, protegidas da luz por 30 minutos com a sonda DFC-DA dissolvida em meio de cultivo na concentração final de 20µM. Após esse período as células foram lavadas com PBS1x 3 vezes, ressuspensas em 500µL de PBS1x gelado e mantidas a 4°C. A leitura foi realizada imediatamente por citometria de fluxo (FACS Calibur) no canal FL1 em escala logarítmica. O *gate*, quando aplicado, foi plotado na população de células viáveis, excluindo-se os restos celulares da análise. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc). Experimento feito em triplicata biológica.

#### **4.6. Análise de produção de Óxido Nítrico (NO).**

A produção de NO foi determinada pela dosagem do total de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nas amostras de soro e sobrenadante de cultura celular, utilizando o método de Griess (Grisham et al., 1996). Para o preparo do reagente de Griess foram misturadas quantidades iguais (1:1) sulfanilamida a 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato a 0,1%, em ácido fosfórico a 2,5%.

Em uma microplaca de 96 poços foram colocados 50µL de cada amostra, em triplicata. Foi construída uma curva padrão com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) nas concentrações de 100 - 1,56µM. Em seguida, foram adicionados 50µL de reagente de Griess aos poços que continham a curva e as amostras. O controle da reação (branco) foi feito pela adição de 50µL de meio de cultura adicionados 50µL do reagente de Griess. Essa placa foi incubada à temperatura ambiente para permitir o desenvolvimento e a estabilização do cromóforo. A absorbância da reação foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540nm. Após a leitura esses dados foram analisados no programa SoftMax. A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio. Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em µM e foram analisadas estatisticamente.

#### **4.7. Dosagem de citocinas**

As citocinas provenientes do soro dos animais do experimento *in vivo* e do sobrenadante de cultura celular foram analisadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kits comerciais (eBioscience e R&D System). O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram bloqueadas com Soro

Fetal Bovino 5% em PBS e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens com solução 0,05% Tween-20 em tampão PBS, foram adicionadas as amostras (50 µL) e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos anti-citocinas conjugados à biotina foram adicionados às placas e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase do kit e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens, substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina foi adicionado às placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M. A absorbância da reação foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda entre 450nm. Após a leitura, esses dados foram analisados no programa SoftMax. A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio. Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em pg/mL e foram analisadas estatisticamente.

#### **4.8. Análise da microbiota intestinal**

##### **4.8.1. Isolamento de DNA de amostras fecais**

Foi realizado com a utilização do kit de isolamento de DNA *MoBio PowerSoil*. O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, 250mg de amostra e 60µL da solução C1 foram adicionados em tubo próprio contendo *beads*, aquecidos por 10 min. a 65°C e agitadas horizontalmente durante 10 minutos com o uso de vórtex. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 10000G por 30 segundos. Ao sobrenadante, foram adicionados 250µL da solução C2. Em seguida, as amostras foram agitadas por 5 segundos com a utilização de vórtex e incubadas a 4 °C por 5 minutos. 200µL da solução C3 foram adicionados, em um volume máximo de 600µL de sobrenadante e brevemente agitado. As amostras foram novamente incubadas a 4 °C por 5 minutos e centrifugadas a 10000G por 2 minutos. A 750µL de sobrenadante obtido durante a centrifugação foram adicionados 1200µL da solução C4 e agitados em vórtex por 5 minutos. A amostra foi adicionada ao tubo próprio contendo um filtro, o qual foi centrifugado a 10000 G por 1 minuto e o líquido descartado. 500µL da solução C5 foram adicionados ao filtro, o qual foi centrifugado a 10000 G por 30 segundos e o líquido novamente descartado. Ao centro do filtro foram adicionados 50µL da solução C6. As amostras foram então centrifugadas a 10000 G por 30 segundos e o produto de filtração foi quantificado em NanoDrop, comparando o valor de absorbância a 260nm com os

valores encontrados em 230 e 280nm. Após quantificação, as amostras foram estocadas a -20°C.

#### **4.8.2. Amplificação do DNAr 16s por PCR**

A PCR foi realizada em placa de 96 poços em ambiente estéril a fim de se evitar que moléculas de DNA e RNA livres no ambiente possam interferir no procedimento. O *Mastermix*, o DNA a ser amplificado e os *primers* foram centrifugados a 500G por 1 minuto. 88µL de *Mastermix* foram transferidos para as colunas 1, 5 e 9 da placa. 8µL de *primers* foram adicionados às mesmas colunas. Colunas 4, 8 e 12 foram usadas como controle negativo do experimento e não continham o DNA molde a ser amplificado. A cada poço das colunas 1, 5 e 9 foram adicionados 3µL do DNA molde. Em seguida a placa foi selada e posta no termociclador. O programa “PTPCR” foi utilizado para obtenção de amplicon.

Tendo em vista avaliar a eficiência do processo da PCR e a qualidade das amostras, os produtos de PCR foram analisados utilizando eletroforese em gel de agarose. As réplicas das amostras foram aplicadas na placa, assim como as réplicas de controles negativos. 5µL do *pool* dos produtos de PCR foram transferidos para outra placa contendo 1,5µL de tampão de amostra. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1,5%, contendo 3 µL de *Sybr green*, juntamente com 5µL de marcador de massa molecular (100 pb), e foram corridas a 120 V por 40 minutos. Uma fotografia do gel foi obtida a fim de se determinar qualidade da amplificação e tamanho do amplicon.

#### **4.8.3. Sequenciamento por Illumina (V4)**

Uma vez comprovada a qualidade das amostras e o seu potencial de amplificação, as amostras foram enviadas para a *facilite* GenomeQuébec num volume de 10-25 µL, a depender da concentração de DNA, para realização sequenciamento os *primers* ILR1SEQ, ILR2SEQ, ILIDXSEQ.

#### **4.8.4. Análise filogenética**

Uma vez realizado o sequenciamento, os dados foram enviados pela empresa e processados no Software Qiime para análise de diversidade e abundância filogenética nas amostras.

### **4.9. Lipidômica feita por MALDI-TOF**

#### **4.9.1. Preparação de amostra e extração de lipídeos**

O método de extração de lipídios foi Bligh-Dyer (1959). Resumidamente, o tecido foi suspenso em 150µL de água Milli-Q. Em seguida, foram adicionados 190µL de clorofórmio e 375µL de metanol, a mistura foi submetida a vortex durante 5 min em 1000rpm. Em seguida, foram adicionados 190µL de clorofórmio e 150µL de água Milli-Q e submetidos a vortex durante 1 min, a mistura foi novamente centrifugada a 14000 G durante 5 minutos para induzir a separação de fases. A camada orgânica inferior foi recolhida, concentrada em *Speed-Vac* e reconstituída em 100µL de uma solução de clorofórmio/metanol (1:1). 1µL da amostra foi aplicado numa placa MALDI e depois seca ao ar. Em seguida, foi aplicado 1µL de matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), preparada a uma concentração de 10mg/mL em MeOH, sobre a amostra seca. A calibração de MS foi realizada usando uma mistura de fosfolípidos composta de DOPE, DMPG, DPPA e DPPS para análise de lipídios.

#### **4.9.2. Análise MALDI-MS**

O MALDI-MS foi realizado num espectrômetro de massa Bruker Autoflex III MALDI-TOF / TOF equipado com um laser de feixe de 334nm. Os perfis foram adquiridos no modo linear TOF e no modo íon positivo com uma extração retardada de 260ns a 20kV de tensão de aceleração. Os perfis de lipídios foram adquiridos no modo refletor TOF e no modo íon positivo. Cada espectro foi coletado manualmente como uma média de 5000 disparos a laser (1000 disparos a laser em 5 posições de pontos diferentes). A energia do laser foi ajustada logo acima do limiar para a produção de íons. Uma gama de m/z 600-1000 foi utilizada para as impressões digitais de lipídeos. Os espectros foram adquiridos em triplicata e a ferramenta *AutoExecute* do software de aquisição Flexcontrol foi utilizada (Versão 2.4; Bruker-Daltonik GmbH) para processamento e apenas picos de íons com uma relação S / N maior que 3 foram considerados.

#### **4.9.3. Análise multivariada de dados MALDI-MS**

Os íons lipídicos foram adquiridos, acumulados e processados usando o software *FlexAnalysis*. Os íons foram alinhados com uma tolerância de massa de m/z 0.4 Da para lipídios. A intensidade relativa dos picos de íons foi normalizada por escalação automática (média-centrada e dividida pelo desvio padrão de cada variável) como pré-processamento para análise multivariada. Ambas as abordagens estatísticas não supervisionadas e supervisionadas foram aplicadas. A análise de componentes principais (PCA) e os mínimos quadrados - análise discriminante (PLS-DA) foram realizados nos dados usando

o *MetaboAnalyst* (software versão 3.0) para discriminar as amostras com base em suas impressões digitais MALDI-TOF MS.

#### **4.10. Extração de tecidos adiposos branco e marrom**

Foram utilizadas fêmeas de 8 semanas, da linhagem C57/BL6 selvagens e deficientes para as proteínas Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, NLRP3<sup>-/-</sup>. Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e tiveram os tecidos coletados da região tubária (WAT) e intra-escapular (BAT). Os tecidos foram dissociados e mantidos por 24h em meio de cultura.

#### **4.11. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)**

Foram utilizadas fêmeas da linhagem C57/BL6 selvagens (WT). Extraídos o fêmur e a tíbia desses camundongos, foi feito um *flush* para retirar as células progenitoras mieloides presentes na medula desses ossos. Essas células foram então diferenciadas em macrófagos utilizando o sobrenadante de fibroblastos de linhagem L929, que secretam o fator de diferenciação GM-CSF. Essa diferenciação dura 1 semana e, após essa semana, os macrófagos ficam em *resting* por 2 dias. Os macrófagos são mantidos em RPMI suplementado com 10% de SFB e 5% de sobrenadante de L929.

#### **4.12. Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos por *Oil Red***

Para analisar a biogênese de corpúsculos lipídicos (CL) por microscopia óptica, as células foram marcadas com *Oil Red* para visualização dos CL.

Para essa análise, células foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após o período de estímulo, o sobrenadante foi descartado e as células fixadas com formalina 3,7% pH 7,4 por 30min. a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS1x e incubadas com propilenoglicol 100% por 5min., após retirada do excesso, foi adicionada solução de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich) a 0,5% em propilenoglicol 100% e incubada, protegida de luz, por 10min. a temperatura ambiente. Após a marcação, as células foram lavadas 1x com propilenoglicol 60% por 3min. e 3x com água destilada para retirada do corante vermelho e foram marcadas com hematoxilina para melhor visualização das células. As células foram visualizadas em microscópio invertido, no aumento de 40x.

As análises de geração de CL e dosagem de citocinas foram realizadas conforme descrito nos itens 4.3 e 4.7, respectivamente.

#### **4.13. Análise estatística**

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando programa GraphPad Prism

6.0, GraphPad Software, Inc. Os testes utilizados foram one-way ou two-way ANOVA para comparação de médias, seguido do pós-teste de Turkey ou test t de student não pareado. A significância estatística foi assumida com valor de  $p \leq 0,05$ .

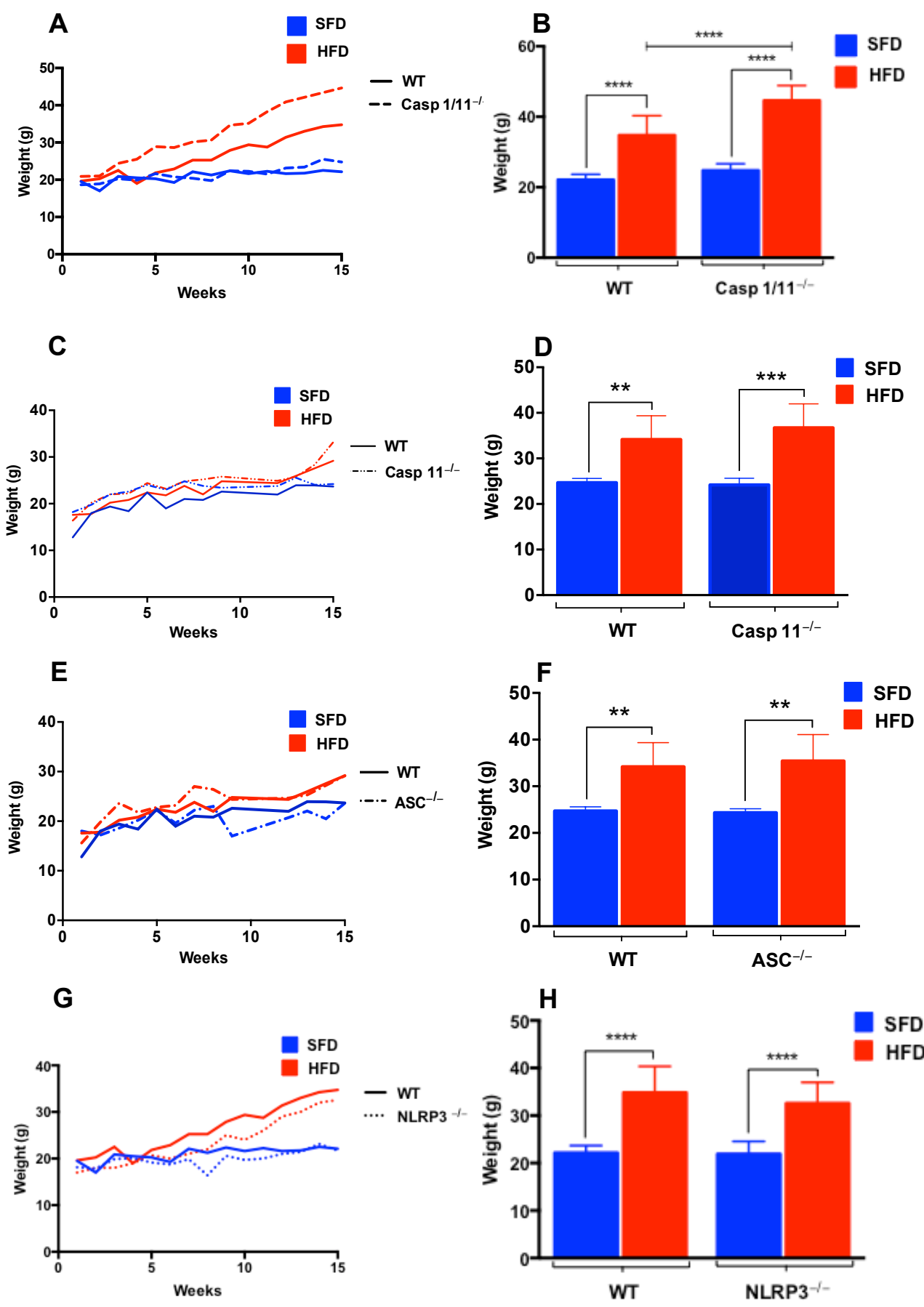
## 5. Resultados

### 5.1. Experimentos *in vivo*

#### 5.1.1. A ausência das caspases 1 e 11 favorece o ganho de peso em animais submetidos a dieta hiperlipídica

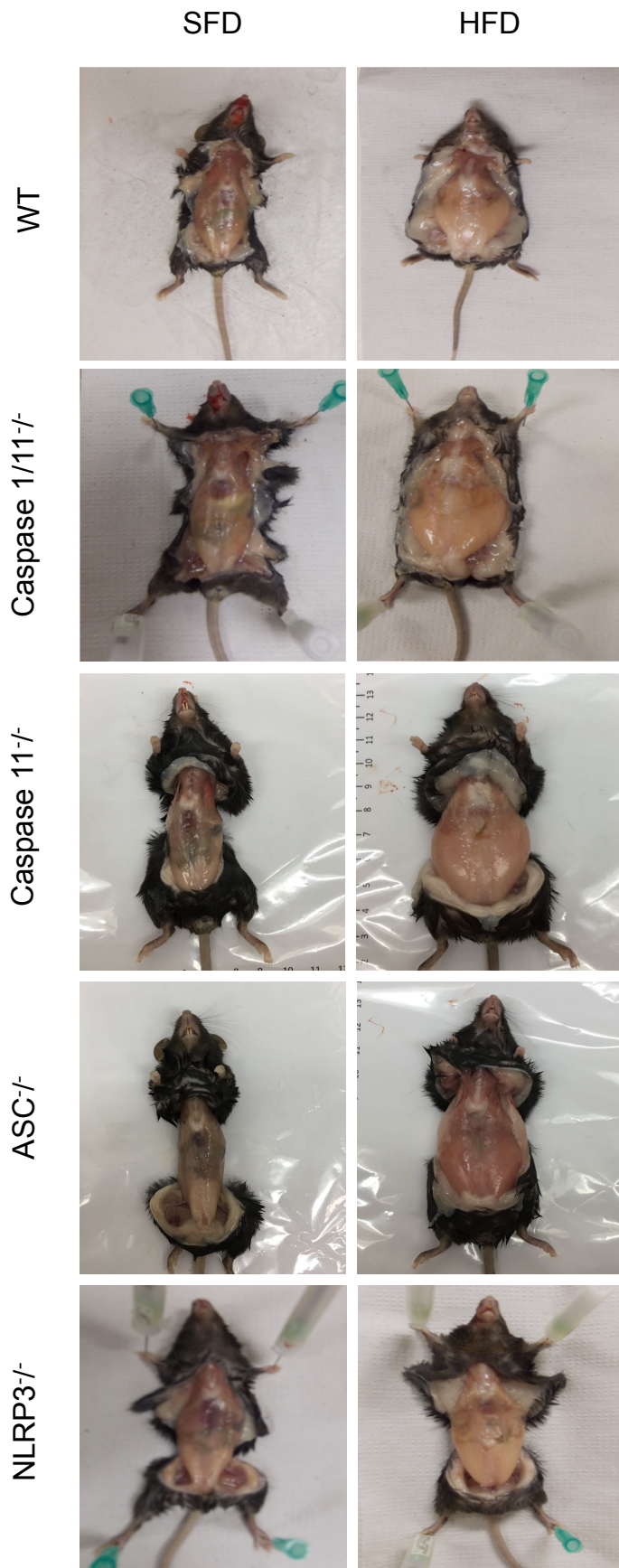
A obesidade em animais selvagens e nocautes (Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>) foi induzida através da dieta hiperlipídica por três meses. Semanalmente os animais eram pesados e a partir dessas pesagens foram montadas as curvas de ganho de peso. Essas curvas mostram que todos os grupos iniciaram os experimentos com os pesos médios similares. Ao final do tratamento, houve um deslocamento para cima da curva de ganho de peso nos animais submetidos a dieta hiperlipídica nos camundongos deficientes para as caspases 1/11 (fig. 1A), seguido dos animais nocautes apenas para caspase 11 (fig. 1C), o final da curva dos animais deficientes para ASC mostrou-se semelhante aos animais selvagens (fig. 1E), enquanto a curva dos animais deficientes de NLRP3 apresentaram um deslocamento para baixo quando comparado aos animais selvagens (fig. 1G). Sendo o peso final dos animais nocautes para caspases 1/11 maior que o peso final dos animais selvagens submetidos à mesma dieta (fig. 1B).





**Figura 1:** Ganho de peso de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. (A, C, E e G) Curva de ganho de peso feita com pesagens semanais e (B, D, F e H) peso dos animais no final do tratamento. Os

resultados estão expressos em forma de média + desvio padrão (n=8). Análise estatística realizada por Anova, onde (\*\*\*\*) representa  $p < 0,0001$ .



**Figura 2:** Imagem do acúmulo de gordura abdominal subcutânea dos animais selvagens (WT), Caspase

1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses.

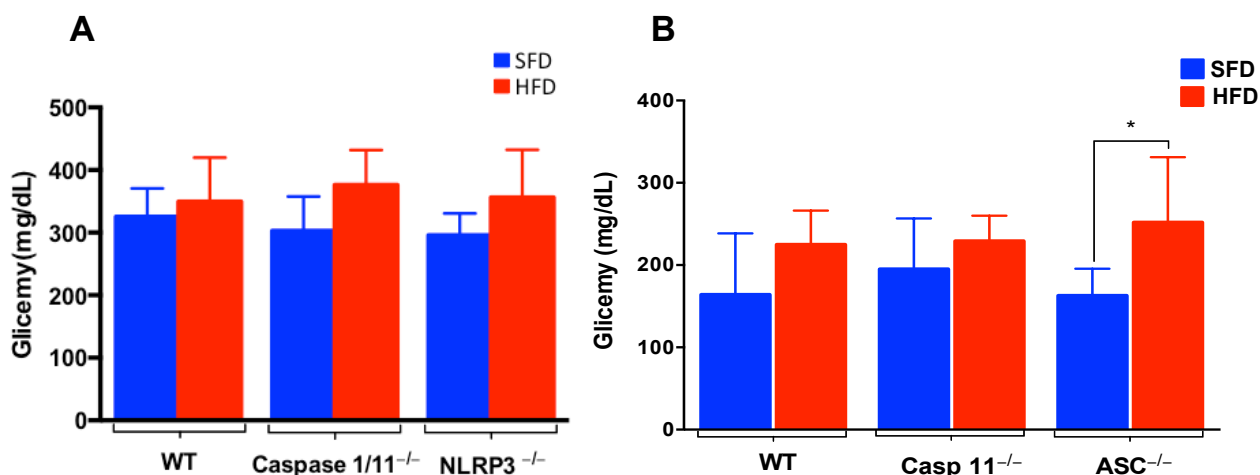
No presente trabalho, em todos os grupos com diferentes genótipos atingiram um peso significativamente diferente após 15 semanas em tratamento com dieta hiperlipídica em relação aos animais controles (ração normolipídica). Ainda, os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) apresentaram um ganho de peso maior que os animais WT submetidos à mesma dieta ao final do tratamento (figura 1B), não houve diferença entre os demais grupos que receberam a dieta HFD em relação aos animais WT, apesar de ser observada uma tendência a um maior ganho peso nos animais Caspase 11<sup>-/-</sup> e menor nos animais NLRP3<sup>-/-</sup>. Dos animais que receberam dieta controle (SFD), não houve diferença significativa entre os grupos, mas da mesma forma podemos observar uma tendência a um maior ganho de peso nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup>.

Esse aumento no ganho de peso pode estar relacionado com a deficiência de IL-18, decorrente da ausência da caspase-1, como visto por Netea e colaboradores (2006) e Wang e colaboradores (2013).

#### **5.1.2. A ausência das caspases 1 e 11 favorece a síndrome metabólica, com aumento de órgãos e esteatose, em animais submetidos a dieta hiperlipídica**

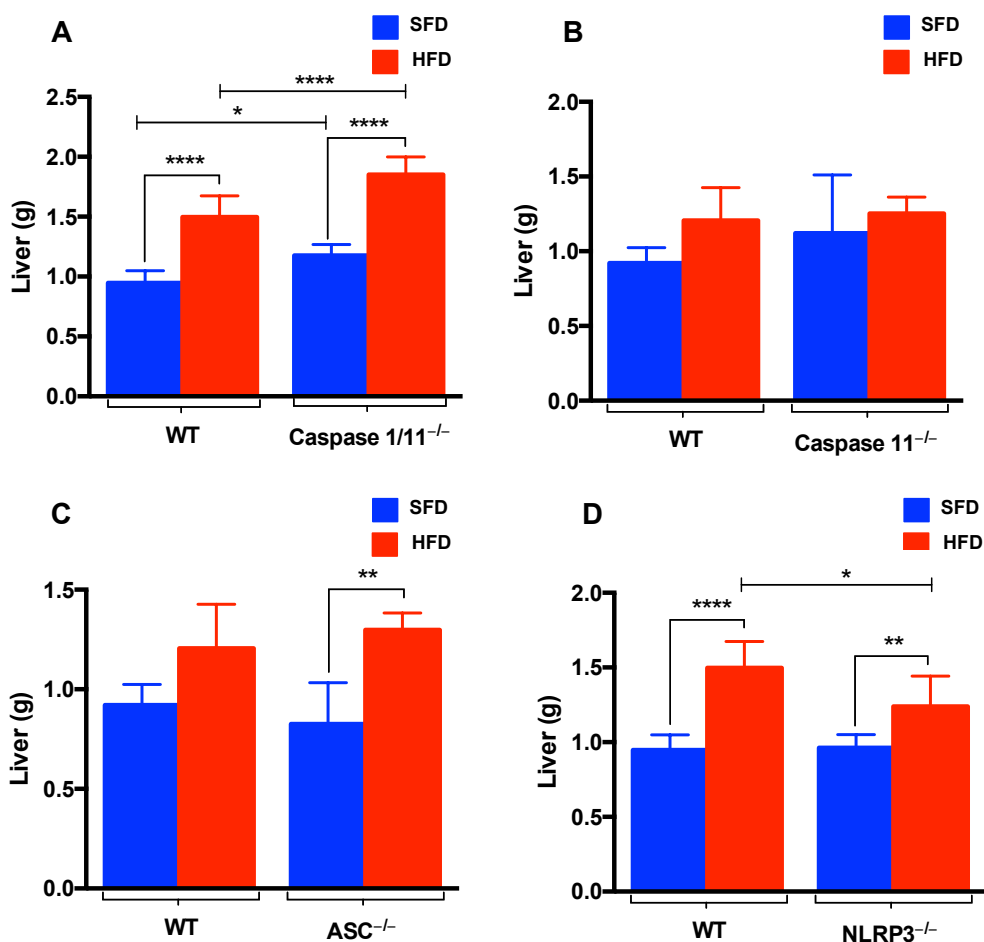
A obesidade pode acarretar síndrome metabólica e resistência à insulina. Os animais, ao final do tratamento, tiveram dosada a glicemia sérica; os dados mostram uma tendência a um aumento nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (fig. 3A e 3B), resultado coerente com os dados do ganho de peso, mostrando que a obesidade nesses animais pode ter causado uma síndrome metabólica e uma possível resistência à insulina.

A glicemia sérica da figura 3A, talvez por não ser valores de jejum, não mostra diferença significativa entre as diferentes genotipagens e dietas, apesar de claramente apresentar uma tendência a ser maior nos grupos que receberam dieta HFD. Já nos grupos que tiveram a glicemia de jejum analisada, figura 3B, apenas o grupo nocaute para ASC apresentou diferença entre os tipos de dieta, porém é possível observar uma tendência em ser maior nos grupos HFD nos demais genótipos.



**Figura 3:** Glicemia sérica de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> (A) e glicemia sérica de jejum de animais WT, Caspase 11<sup>-/-</sup> e ASC<sup>-/-</sup> de jejum (B) submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa  $p < 0,05$ .

Também foram observadas alterações no fígado (figura 4) e coração (figura 6), caracterizando uma obesidade clássica avançada com esteatose hepática (figura 5) e hipertrofia ventricular.

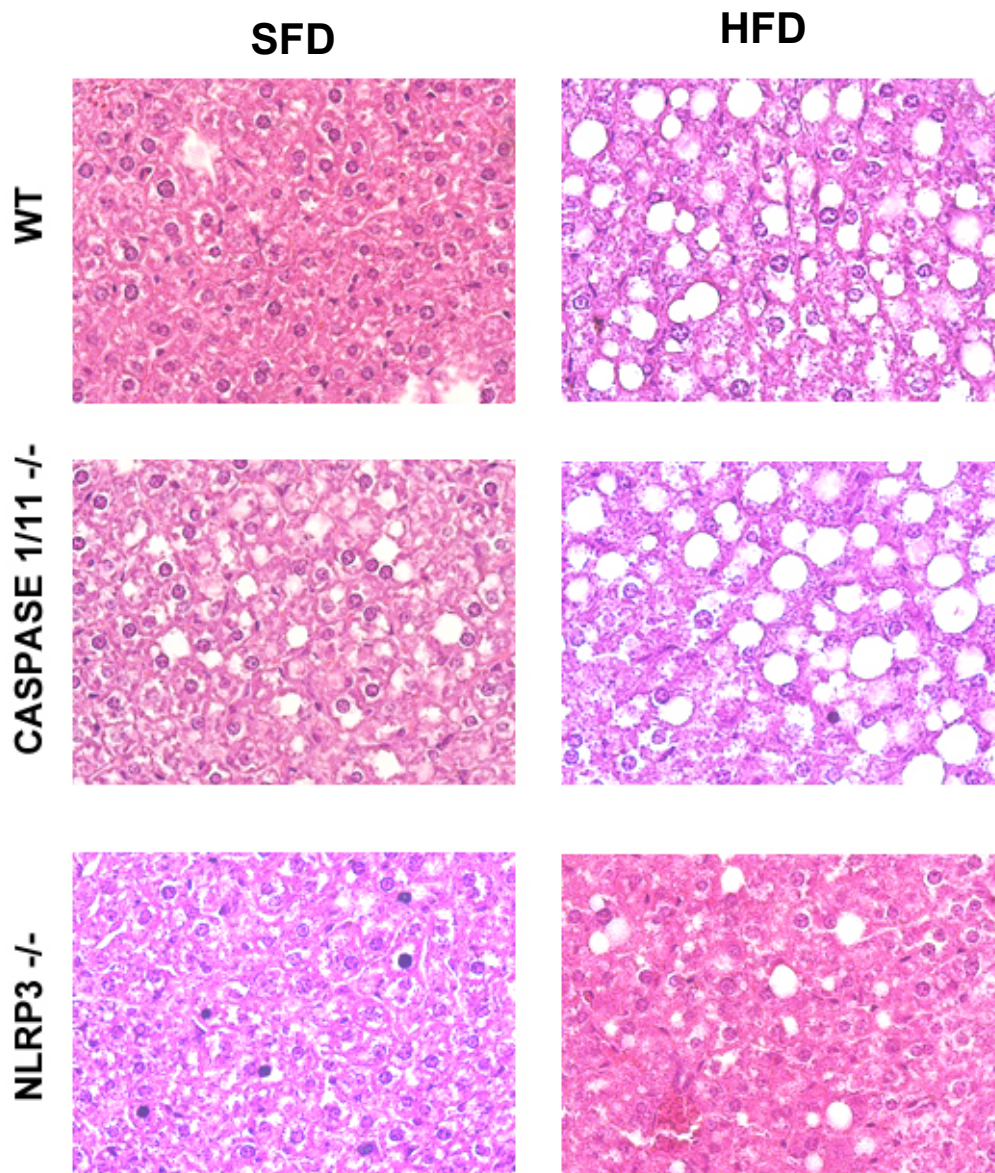


**Figura 4:** Peso dos fígados (A) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa

p<0,05, (\*\*) representa p<0,01, (\*\*\*) representa p<0,005 e (\*\*\*\*) representa p<0,0001.

Todos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) tiveram um aumento do fígado quando comparados aos grupos controles (SFD), com exceção dos animais nocautes para Caspase 11. Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) apresentaram um aumento ainda maior, havendo uma diferença quando comparados aos outros grupos submetidos à dieta hiperlipídica. Nos animais que receberam a dieta controle (SFD), o grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup> também apresentou um aumento no fígado quando comparados aos animais WT e NLRP3<sup>-/-</sup> (figura 4A).

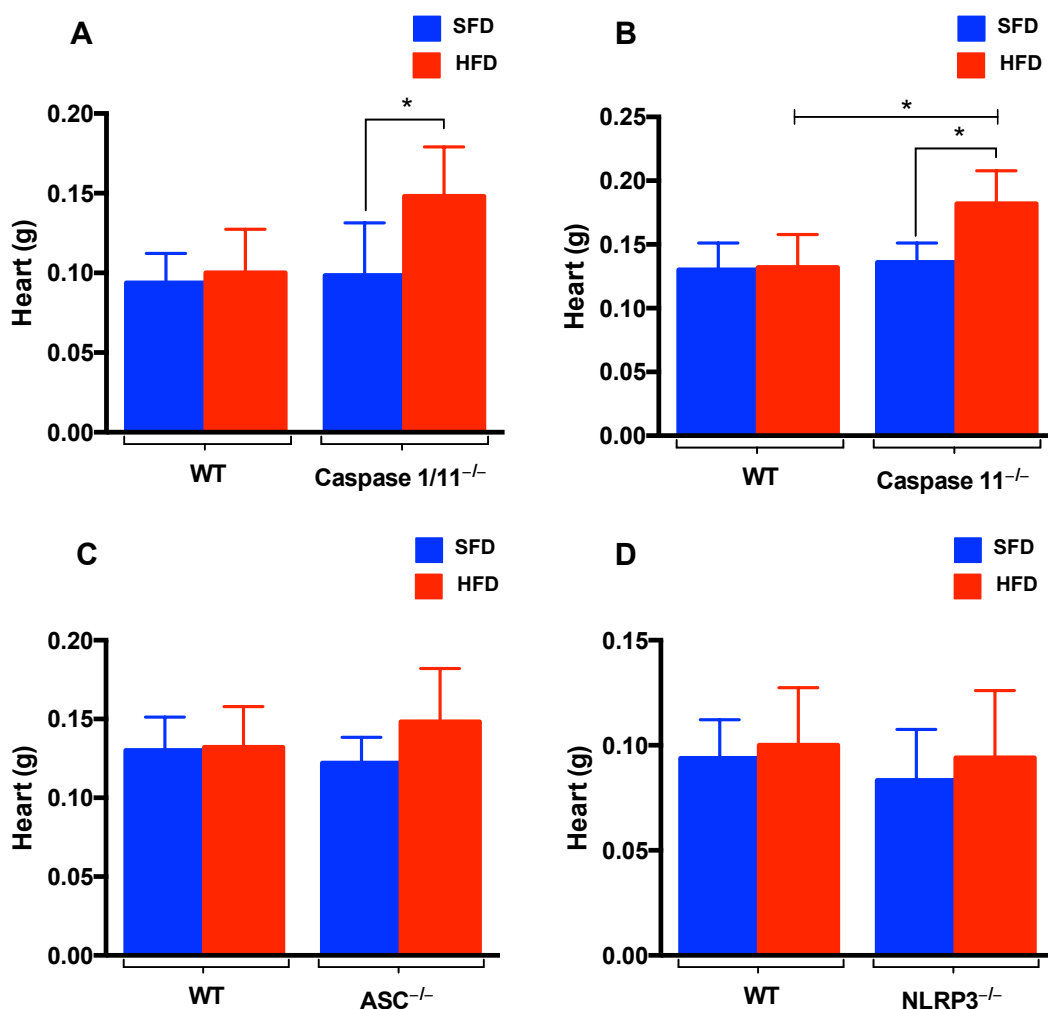
A histopatologia dos fígados confirma os dados, mostrando esteatose nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) e também no grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup> controle (SFD), semelhante ao grupo NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD), que teve uma menor formação de vesículas comparado aos outros grupos submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) (figura 5). O que ratifica a importância da caspase-1 no metabolismo lipídico.



**Figura 5:** Lâminas histológicas de fígados de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. As imagens foram feitas usando aumento de 40x e a coloração por H&E.

Foi observado um aumento de peso nos corações dos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e Caspase 11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) (fig. 6A e 6B). Esse aumento pode ser devido à hipertrofia ventricular associada à obesidade ou por complicações cardiovasculares advindas da síndrome metabólica (63). Esse aumento não foi visto nos grupos WT, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD).





**Figura 6:** Peso dos corações (A) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa  $p < 0,05$ .

### 5.1.3. A dieta hiperlipídica intensifica a modulação da composição global lipídica do fígado pelo inflamassoma NLRP3 e caspase-1/11

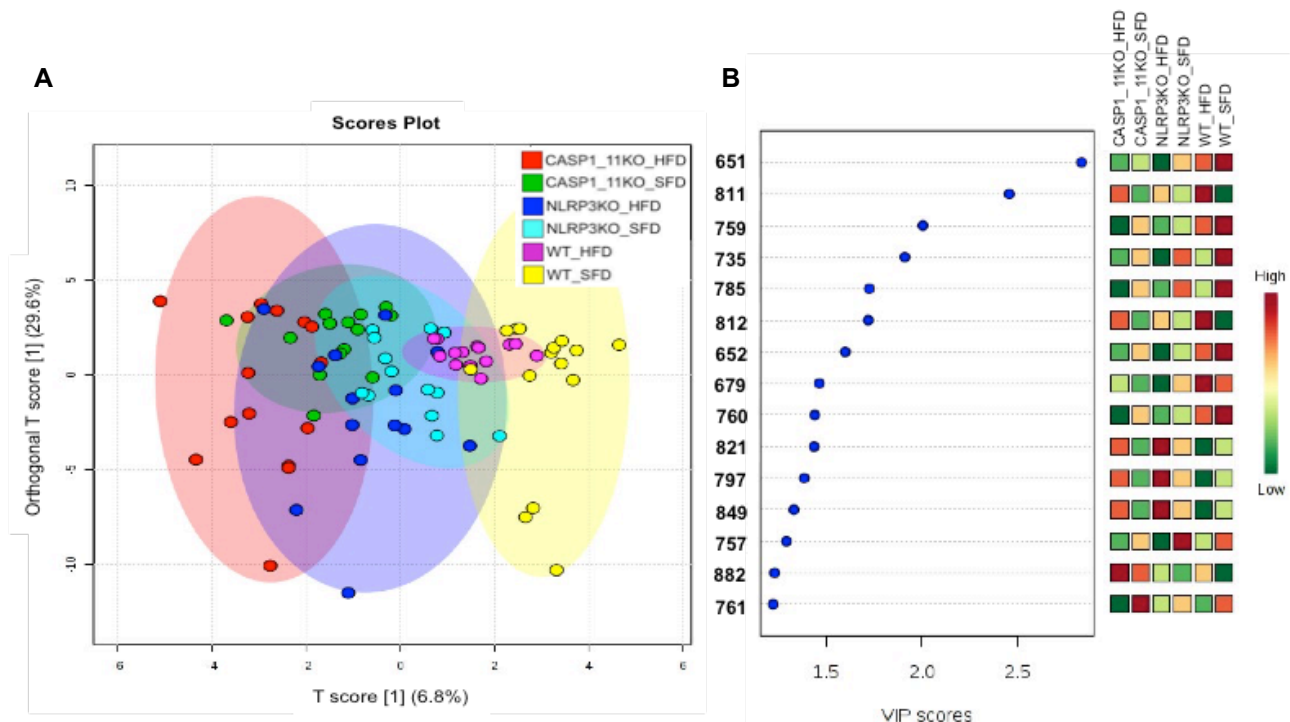
Tendo os fígados dos animais apresentado uma diversidade no metabolismo lipídico, com uma diferença entre os pesos e acúmulo de gordura, analisamos a composição lipídica nesses órgãos.

A figura 6 revela que o sistema biológico é extremamente complexo e não pode ser descrito por um número reduzido de metabólitos. Nota-se nos gráficos OPLS-DA (fig. 7A, 7C e 7E) que em todos os casos a variância explicada apenas por duas componente é menor do que 50%, observa-se apenas uma boa separação entre os grupos dos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e WT (fig. 7A). Os metabólitos que mais contribuem para essa separação

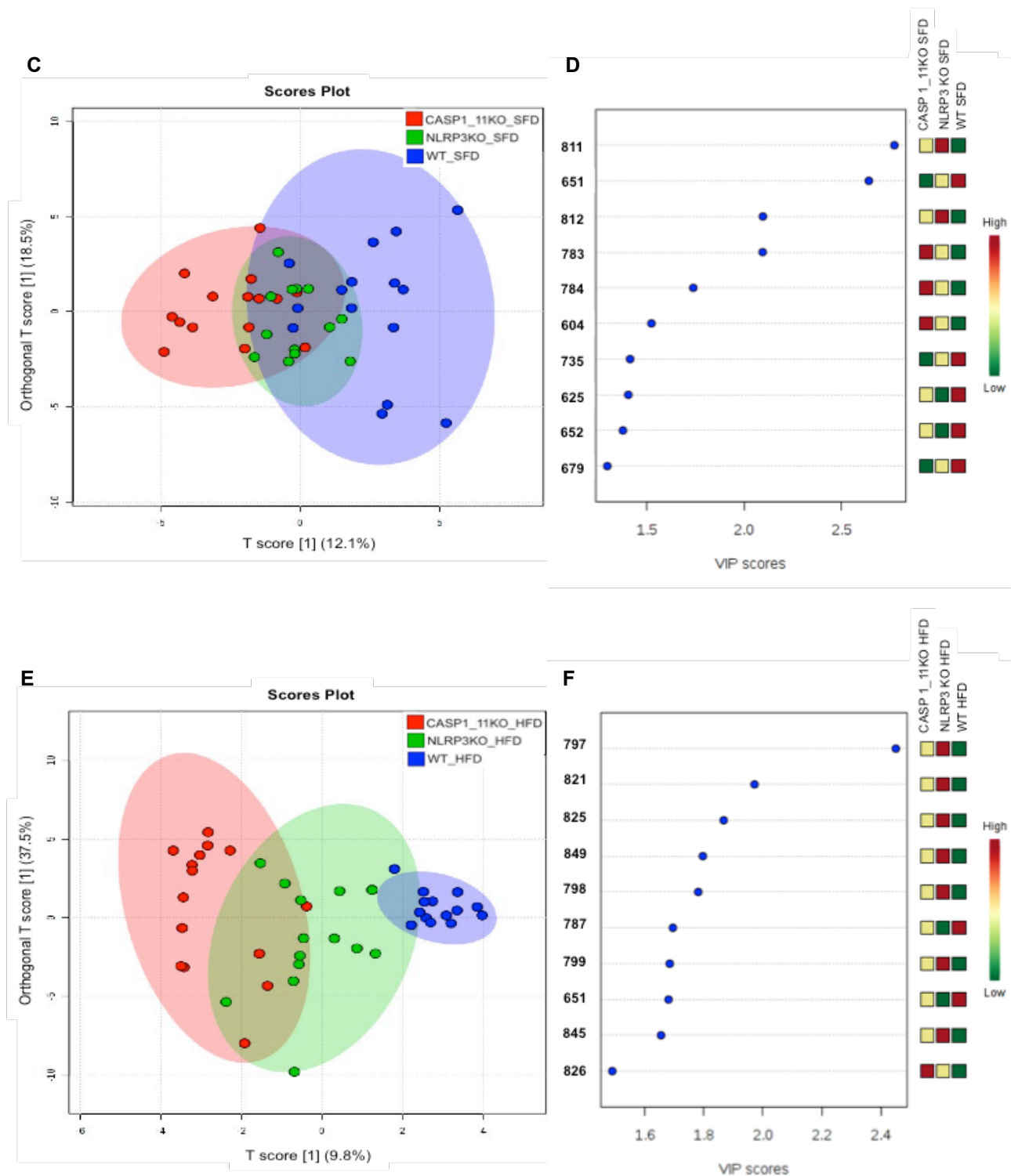
são mostrados no gráfico VIP na figura 7B no qual pode-se observar que a maioria dos metabólitos apresenta maior abundância relativa no grupo WT.

A mesma tendência de separação dos grupos Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e WT permanece em ambos os tratamentos recebidos, SFD (fig. 7C) e HFD (fig. 7E), porém a separação é maior nos que receberam a dieta HFD, mostrando que a dieta potencializa o efeito da ausência das caspases 1 e 11.

Quando observamos o metabólito com maior influência nos grupos de mesmo genótipo que receberam dietas diferentes, temos o ions 651 para animais WT que receberam SFD (fig. 7D) e o ion o 787 para a dieta HFD (fig. 7F), nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> os ions que apresentaram maior abundancia relativa foi o 783, para os animais SFD (fig. 7D), e o 826, para os animais tratados com HFD (fig. 7F). Curiosamente, quando observamos os metabólitos de maior influência nos grupos NLRP3<sup>-/-</sup> vimos ions muito próximos de maior abundancia relativa, 811 na SFD (fig. 7D) e 797 na HFD (fig. 7F), mostrando que a dieta não modula a diversidade de lipídeos de forma tão significativa quanto nos outros grupos.



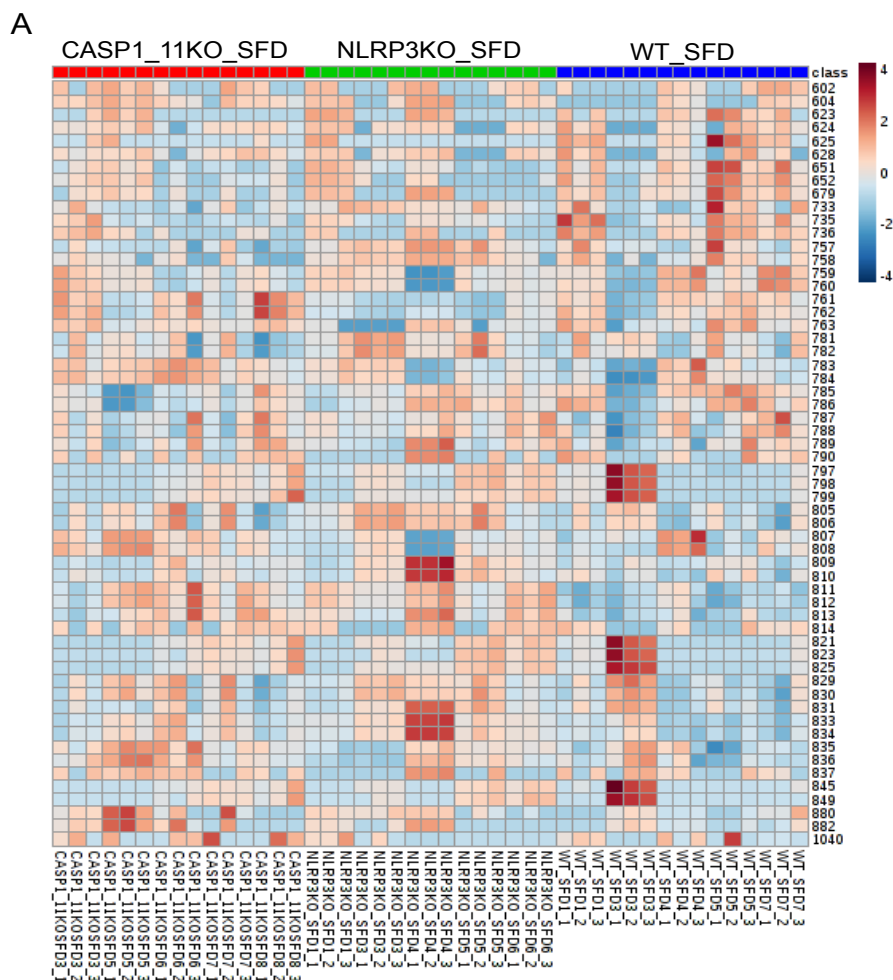


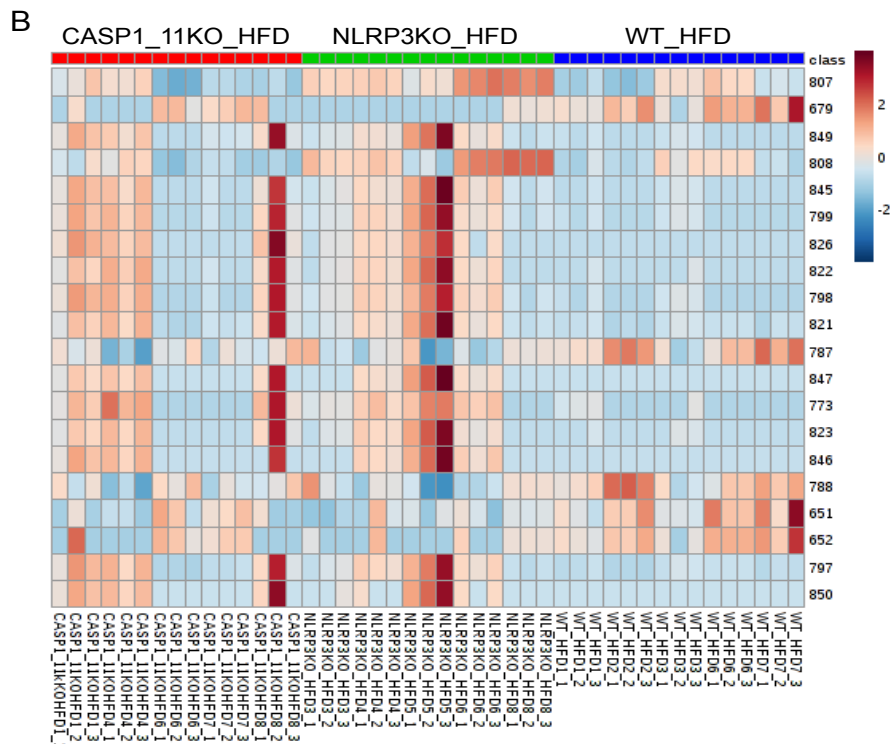


**Figura 7:** Análise da composição lipídica dos fígados de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Dados construídos usando dados da metabolômica de MALDI: Plot da análise discriminante - *Orthogonal Partial Least Squares* (OPLS\_DA) (A, C e E) e os espectros de massa importantes encontrados, onde as cores correspondem às concentrações relativas de cada metabólito nos grupos (B, D e F).

Para analisar comparativamente os grupos utilizando todos os metabolitos detectados foi utilizada a análise hierárquica de componentes (HCA). Nota-se que os três genótipos são completamente diferenciados pelo HCA, os grupos Caspase1/11<sup>-/-</sup> e WT

são os mais distintos em termos de composição ou abundância relativa dos metabolitos enquanto o grupo NLRP3<sup>-/-</sup> pode ser considerado como intermediário (Figura 8). Com relação às distintas dietas recebidas, o grupo WT apresenta metabolitos de 600-800 m/z com maior abundancia relativa media quando comparado aos grupos Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> que receberam a dieta SFD (fig. 8A). Na dieta HFD, observou-se que os metabolitos de m/z 679, 787 e 651 discrimina o grupo WT dos demais (fig. 8B). Por outro lado, os metabolitos 849, 845, 799, 826, 822, 798, 847, 823, 797 e 850 tem maior peso nos grupos Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> que receberam a dieta SFD (fig. 8A).





**Figura 8:** Agrupamento dos espectros de massa encontrados análise discriminante *Partial Least Squares* (PLS-DA) da composição lipídica no fígado de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) (A) ou hiperlipídica (HFD) (B) por 3 meses. Mapa de calor com um termômetro de código de cor indicando as concentrações relativas de metabólitos em cada grupo.

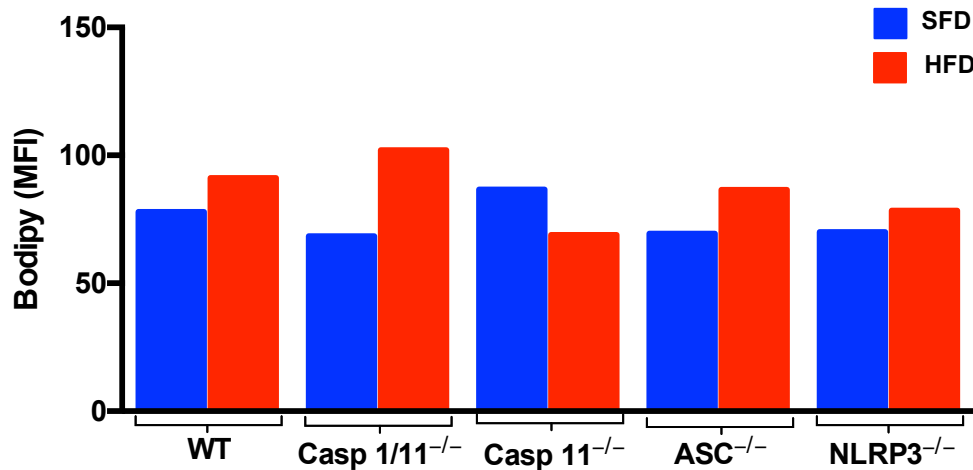
#### 5.1.4. A ausência das caspases 1 e 11 leva a uma maior biogênese de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal

Corpúsculos lipídicos (CLs) são marcadores de ativação celular e importantes sítios de síntese e armazenamento de mediadores lipídicos celulares (64). Essas organelas são distribuídas no citoplasma da maioria das células eucarióticas, possuem uma região central composta de lipídeos neutros e são envoltas por uma monocamada de fosfolipídios associados a proteínas (65).

CLs são especializados em armazenar lipídios neutros, triacilglicerol, colesterol-éster e fosfolipídios, associados a uma variada composição protéica. O armazenamento de lipídios celulares é variável e reflete o balanço entre a chegada dos lipídios nas células e o seu consumo por elas; um acúmulo excessivo de CLs também ocorre em diversas doenças como a obesidade, esteatose, diabetes, miopatia e aterosclerose (66). Atualmente, já se sabe que CLs são organelas altamente reguladas que estão envolvidas em vários aspectos de ativação e metabolismo celular, inclusive no processo inflamatório (67).

Dos grupos que receberam ração controle (SFD), o grupo Caspase 11<sup>-/-</sup> apresentou uma maior biogênese de CLs. Curiosamente, uma vez tratado com ração hiperlipídica

(HFD), houve uma diminuição na biogênese de corpúsculo lipídico (figura 9). Mostrando que a ativação celular das células do peritônio está relacionada com o inflamassoma NLRP3, não apenas com a dieta rica em lipídeos e/ou ao ganho de peso.



**Figura 9:** Corpúsculos lipídicos em células peritoneais de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, Caspase 11<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. A marcação foi feita em *pool* de células dos animais de cada grupo com sonda bodipy. As barras representam os valores de média de intensidade de fluorescência (MFI) adquiridos a partir de leitura feita por FACS no canal FITC/FL1.

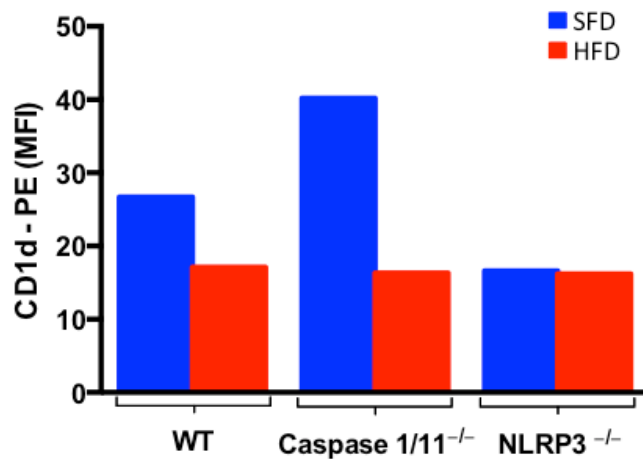
#### 5.1.5. A ausência das caspases 1 e 11 favorece o aumento de moléculas apresentadoras de antígenos lipídicos, que é independente da obesidade

A molécula de CD1d é uma apresentadora de antígenos similar à molécula MHCI, porém elas apresentam antígenos lipídicos, e não peptídicos, para linfócitos T CD8 e células NKT, levando a uma resposta citotóxica. (68). CD1d é expressa na superfície de células dendríticas, macrófagos, células endoteliais e hepatócitos (69). Recentemente, foi descrita uma expressão de CD1d em tecido adiposo maior que no fígado, porém a expressão de CD1d e a população de células NKT (moduladas fisicamente pela interação com CD1d) foram diminuídas na obesidade (70).

Visando investigar o papel do inflamassoma NLRP3 na inflamação crônica que há na obesidade, quantificamos a apresentação de moléculas CD1d na superfície das células peritoneais. Os animais obesos, submetidos à dieta hiperlipídica, não apresentaram diferença (figura 9). Mostrando que não há envolvimento do inflamassoma na apresentação de antígenos lipídicos em animais obesos.

Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à ração controle (SFD) apresentaram um aumento na apresentação de CD1d quando comparados aos WT e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos ao mesmo tratamento (figura 10), mostrando ativação dessas células via CD1d

dependente da ausência de caspases 1 e 11.

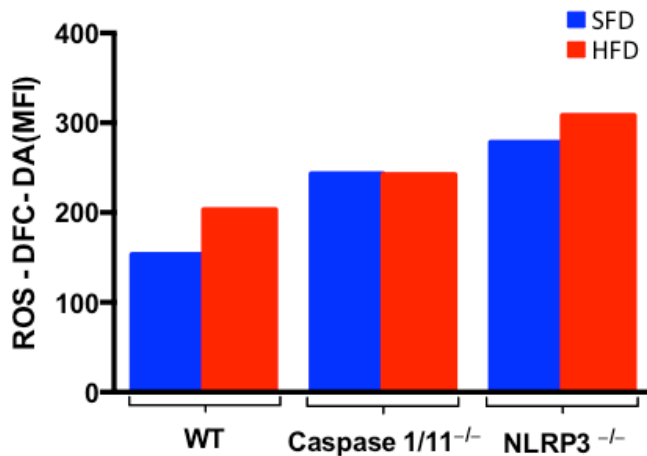


**Figura 10:** Apresentação de moléculas CD1d em células peritoneais de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. A marcação foi feita em *pool* de células dos animais de cada grupo com anticorpo conjugado a PE. As barras representam os valores de média de intensidade de fluorescência (MFI) adquiridos a partir de leitura feita por FACS no canal PE/FL2.

#### 5.1.6. A ausência da proteína NLRP3 favorece o aumento do estresse oxidativo

Os radicais livres compreendem átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, a presença de elétrons desemparelhados atribui propriedades paramagnéticas aos radicais, que podem ter carga positiva, neutra ou negativa (71).

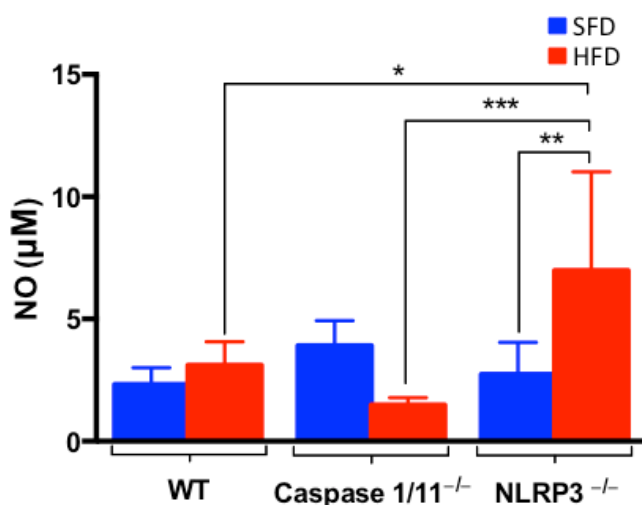
Dentre os radicais livres produzidos no organismos, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidos na cadeia respiratória e têm importante ação na proteção contra patógenos, mas em excesso causam danos celulares devido à sua capacidade de ganhar e perder elétrons. O estresse oxidativo causado pelas ROS é um importante sinal para a ativação do inflamassoma (72).



**Figura 11:** Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células peritoneais de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. A marcação foi feita em *pool* de células dos animais de cada grupo com sonda DFC-DA. As barras representam os valores de média de intensidade de fluorescência (MFI) adquiridos a partir de leitura feita por FACS no canal FITC/FL1.

A figura 11 mostra um aumento na produção de ROS nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> em comparação com os animais WT, tanto nos grupos controles (SFD) quanto nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (HFD), porém nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> não houve aumento da produção de ROS quando submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) em comparação à dieta controle (SFD), fenômeno observado no animais WT e NLRP3<sup>-/-</sup>.

Assim como ROS, o óxido nítrico (NO) leva ao estresse oxidativo e é produzido como defesa, principalmente por macrófagos (73). Além de uma ação microbicida, o NO desempenha distintas funções no organismo, tendo ação vasodilatadora no endotélio, regulação da respiração mitocondrial, como neurotransmissor e, mais recentemente, o NO se mostrou um importante regulador do metabolismo energético e da composição corporal.



**Figura 12:** Quantificação de óxido nítrico (NO) no soro de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à (A) dieta normolipídica ou (B) hiperlipídica submetidos à dieta hiperlipídica por 3

meses. Foi usado reagente de Greiss para a reação colorimétrica e a quantificação foi feita a partir de curva de concentração previamente conhecida. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=8). Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa  $p < 0,05$ , (\*\*) representa  $p < 0,01$  e (\*\*\*) representa  $p < 0,005$ .

No presente estudo, foi dosado o NO sistêmico a partir do soro dos animais. Não houve diferença entre os grupos submetidos à ração controle (SFD) (figura 12), porém é possível observar uma tendência ao aumento de NO no grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup>. Já nos grupos que foram submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) houve uma diminuição de NO nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e um aumento no grupo NLRP3<sup>-/-</sup>, que tiveram, respectivamente, o maior e o menor peso dos grupos que receberam a dieta hiperlipídica, quando comparados aos animais WT que receberam o mesmo tratamento.

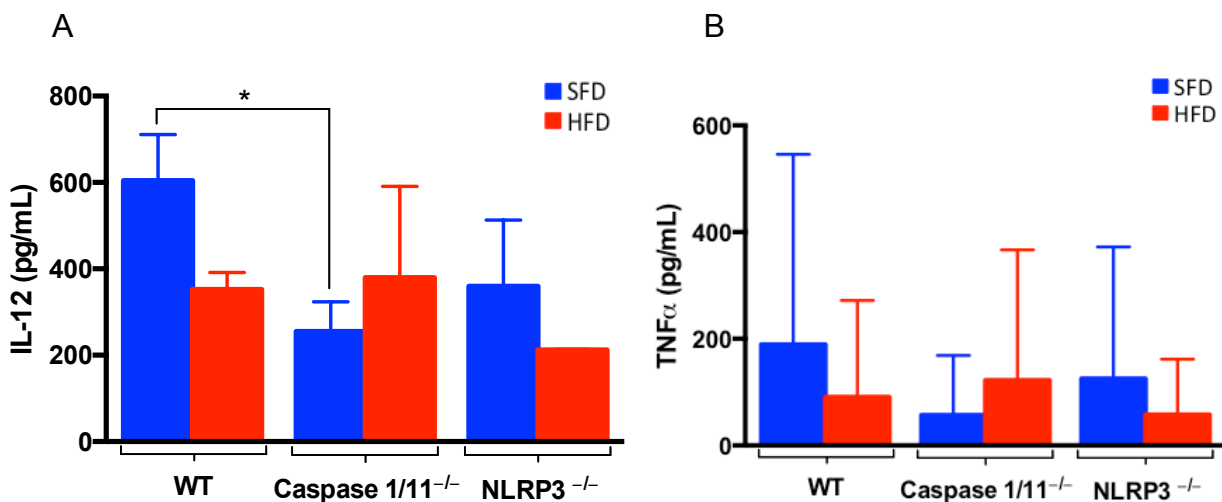
#### **5.1.7. A ausência das caspases 1 e 11 modula a secreção de IL-12 em animais submetidos a dieta hiperlipídica**

Evidências crescentes estabelecem um papel para a inflamação crônica no desenvolvimento de resistência à insulina induzida pela obesidade. Em estudos *in vitro* e *in vivo* a depleção de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas elevadas na obesidade aumentou a sinalização de insulina (74,75).

As citocinas da família IL-12 são mais expressas em células apresentadoras de antígenos e têm um papel fundamental durante o estresse inflamatório. Recentemente as IL-12 receberam um destaque ainda maior como mediadores inflamatórios potenciais que ligam obesidade e resistência à insulina, sendo sua expressão regulada em tecidos responsivos à insulina em condições de obesidade (76).

Outra citocina pró-inflamatória mediadora da resistência à insulina na obesidade é o TNF $\alpha$ , uma vez que é super expresso em tecido adiposo e bloqueia a ação da insulina *in vitro* e *in vivo* (75,77).

Afim de analisar a secreção de citocinas pró-inflamatórias em animais obesos nocautes para proteínas do inflamassoma NLRP3, foi feita a dosagem de IL-12 (figura 13A) e TNF $\alpha$  (figura 13B) no soro desses animais.



**Figura 13:** Quantificação de IL-12 (A) e TNF $\alpha$  (B) no soro de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) ou hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=8). Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa p<0,05.

O grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup> que recebeu a ração normolipídica (SFD) apresentou uma diminuição na secreção de IL-12 quando comparado ao grupo WT (figura 13A). Apesar de não significativo, podemos observar uma tendência ao aumento de IL-12 no grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) quando comparado ao grupo SFD, diferente do padrão observado nos demais genótipos.

Não houve diferença entre os grupos de animais obesos (HFD), mas observa-se uma tendência de diminuição da secreção de IL-12 no grupo NLRP3<sup>-/-</sup>, quando comparados aos animais WT e Caspase 1/11<sup>-/-</sup> que também receberam a dieta normolipídica (SFD).

A secreção de TNF $\alpha$ , apesar de não ter diferenças significativas, tende a seguir o mesmo padrão de secreção da outra citocina pró-inflamatória IL-12.

### 5.1.8. O inflamassoma NLRP3 participa da modulação da microbiota pela obesidade

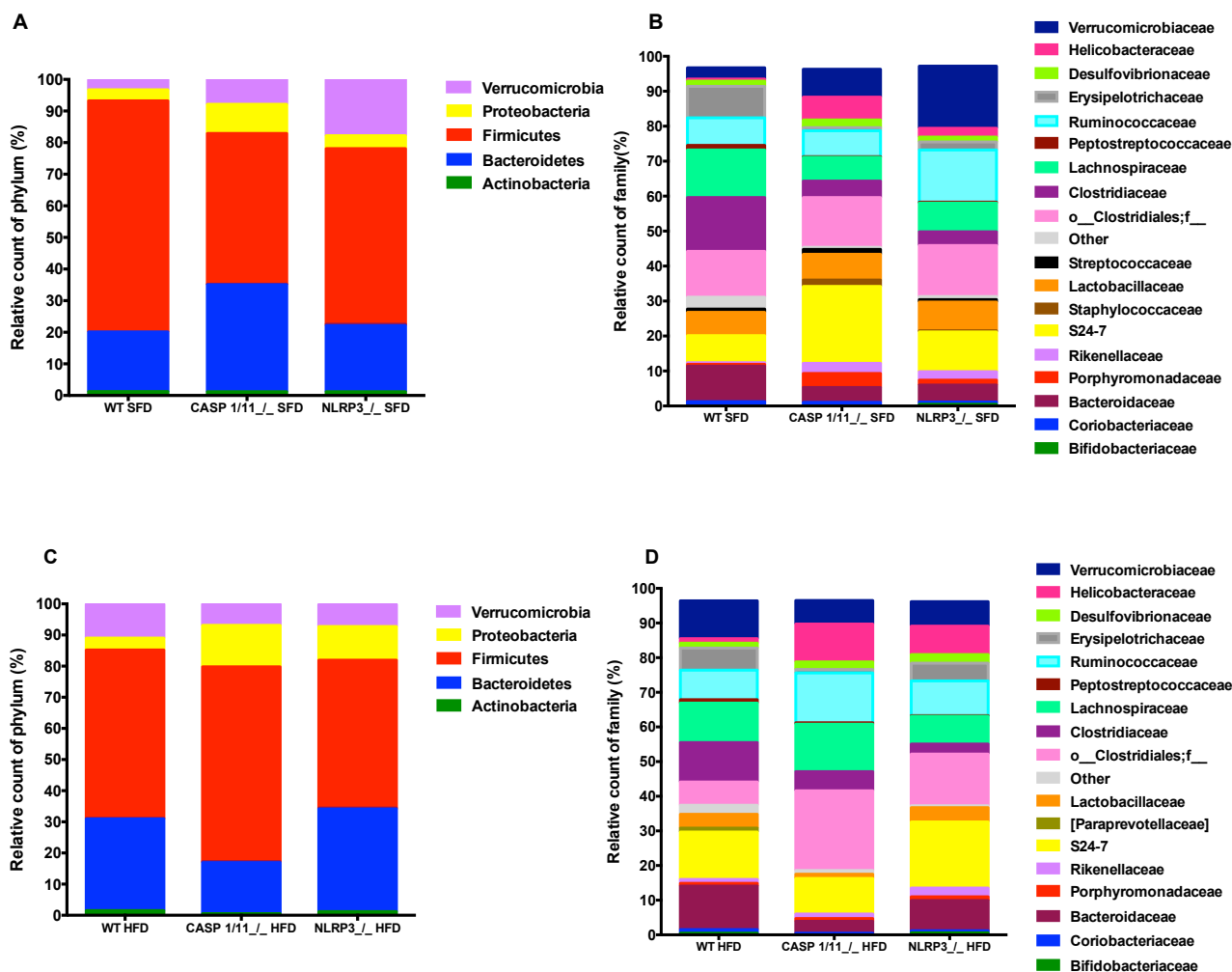
Diferenças na microbiota intestinal relacionada ao peso corporal (78), sendo essa diversidade atribuída a fatores como genética, alimentação, idade, entre outros. A estreita relação da microbiota intestinal e a obesidade, apesar de não totalmente elucidada, já foi amplamente mostrada.

Não só a obesidade, mas muitas doenças estão associadas à modificação do microbioma intestinal e a dieta é capaz de remodelar profundamente a composição microbológica em horas (79). A ingestão de álcool ou uma dieta rica em ácidos graxos saturados, colesterol e frutose prejudica a barreira intestinal, reduzindo a defesa



associada ao muco e enfraquecendo a função da junção tecidual, causando inflamação intestinal com subsequente fluxo de metabólitos microbianos e translocação de patógenos bacterianos para a corrente sanguínea (endotoxemia) e fígado. As alterações na permeabilidade intestinal, endotoxemia e interação com ácidos biliares podem contribuir para o aparecimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (59) e resistência à insulina, o que pode ser prevenido pela alimentação (80,81).

A ausência de Caspase 1/11 e do NLRP3 modularam a composição da microbiota (fig. 14A e 14B). Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, que apresentaram um nível inicial de esteatose hepática quando tratados com dieta SFD (fig. 5), apresentaram a maior porcentagem (9,2%) de Proteobacterias (associadas com NAFLD) (Tabela 1) quando comparados aos outros grupos que receberam a mesma dieta, mais de duas vezes maior que a quantidade encontrada nos animais selvagens.



**Figura 14:** Composição taxonômica, filos e famílias, de microbiota intestinal de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD) (A e B) ou hiperlipídica (HFD) (C e D) por 3 meses.

Os animais que alimentados com dieta HFD tiveram uma modulação nos filos Firmicutes e Bacteroidetes coerente com os dados do ganho de peso (fig. 1). Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> apresentaram 62,6% de abundância de Firmicutes, enquanto que os WT apresentaram 54,1% e os NLRP3<sup>-/-</sup> 47,5%; a abundância de Bacteroidetes foi de 16,4%, 29,4% e 32,9%, respectivamente (Tabela 2). A relação entre os dois filos, relacionada com o ganho de peso e obesidade, foi maior nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> (F/B: 3,81), mais que o dobro dos outros grupos alimentados com a mesma dieta (WT F/B: 1,84 e NLRP3 F/B: 1,44).

**Tabela 1:** Filos, famílias e gêneros com abundância  $\geq 1\%$  nos grupos de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (SFD).

Taxonomy	WT SFD	CASP1/11 <sup>-/-</sup> SFD	NLRP3 <sup>-/-</sup> SFD
p__Actinobacteria	1.2%	1.1%	1.1%
p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae	1.2%	1.0%	0.6%
p__Bacteroidetes	18.9%	33.9%	21.0%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae	10.2%	4.3%	4.9%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides	10.2%	4.3%	4.9%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae	0.5%	4.0%	1.4%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides	0.5%	4.0%	1.4%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae	0.5%	2.9%	2.4%
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7	7.7%	22.0%	11.4%
p__Firmicutes	73.1%	47.7%	55.6%
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Staphylococcaceae	0.0%	1.8%	0.3%
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Staphylococcaceae;g__Staphylococcus	0.0%	1.6%	0.3%
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae	6.7%	7.4%	8.2%
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus	6.7%	7.4%	8.2%
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Streptococcaceae	0.9%	1.4%	0.7%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;Other	3.4%	0.6%	0.9%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__	13.1%	14.2%	14.6%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae	15.4%	4.7%	3.9%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__	15.2%	4.6%	3.8%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae	13.6%	6.8%	8.2%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;Other	1.1%	0.2%	0.2%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__	2.5%	3.7%	3.8%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Coproccoccus	1.5%	0.8%	0.8%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	4.7%	0.1%	0.3%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus]	3.8%	2.1%	3.0%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptostreptococcaceae	1.3%	0.2%	0.3%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae	7.9%	7.4%	14.9%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__	3.2%	3.6%	9.6%
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Oscillospira	4.1%	3.1%	4.5%
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae	9.0%	0.9%	2.3%
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Allobaculum	8.5%	0.3%	1.4%
p__Proteobacteria	3.5%	9.2%	4.1%
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae	1.5%	2.2%	1.4%
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__	0.7%	1.1%	0.9%
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__Desulfovibrio	0.8%	1.0%	0.4%
p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae	0.6%	6.5%	2.5%
p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae;g__	0.0%	6.1%	2.3%
p__Verrucomicrobia	3.2%	8.0%	17.8%

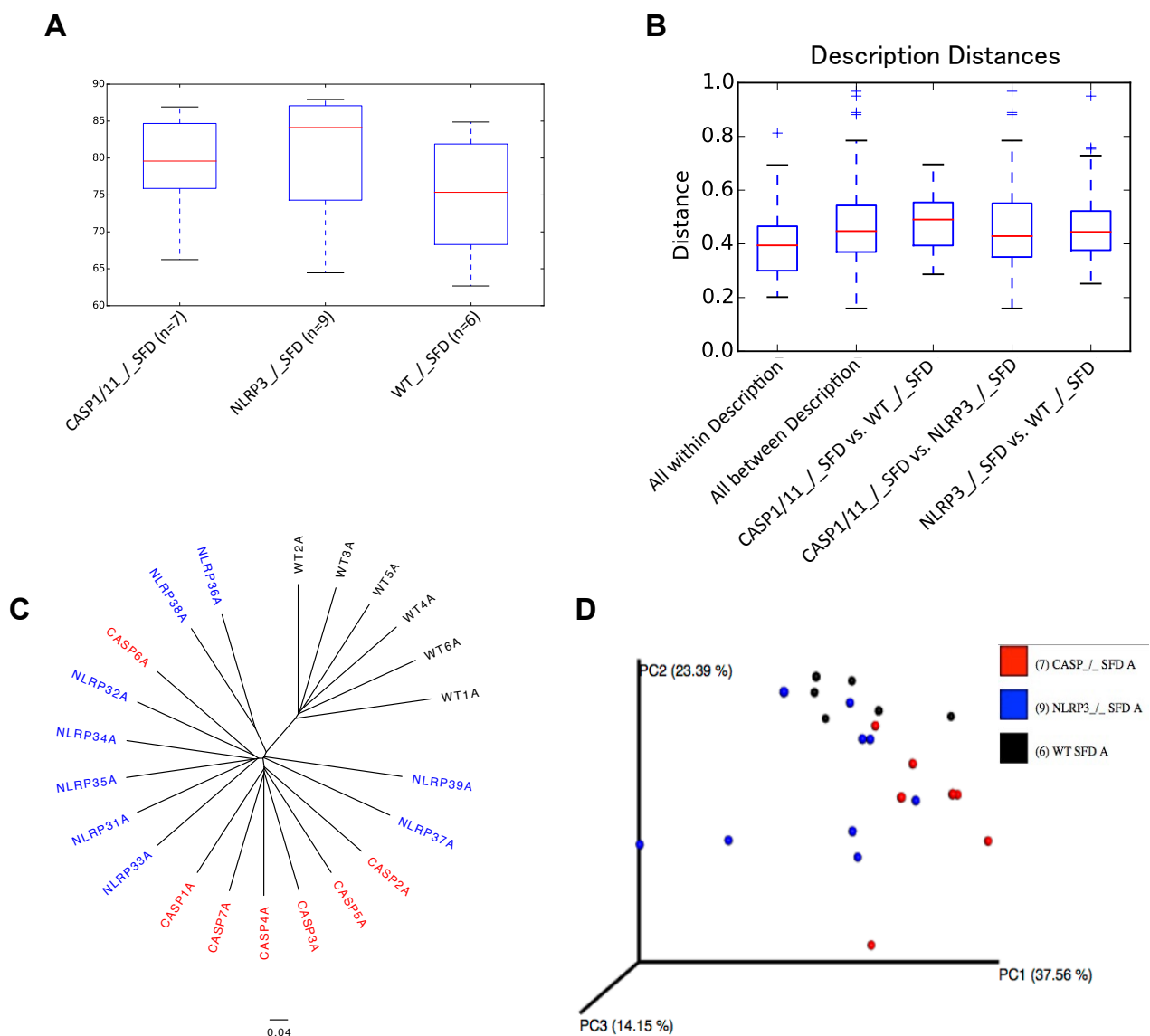
**Tabela 2:** Filos (p<sub>\_</sub>), famílias (f<sub>\_</sub>) e gêneros (g<sub>\_</sub>) com abundância ≥ 1% nos grupos de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta normolipídica (HFD).

Taxonomy	WT	HFD	CASP1/11 <sup>-/-</sup>	HFD	NLRP3 <sup>-/-</sup>	HFD
p__Actinobacteria	1.5%	0.5%	1.2%			
p__Actinobacteria;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae	1.0%	0.5%	0.6%			
p__Bacteroidetes	29.4%	16.4%	32.9%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae	12.6%	3.4%	8.7%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides	12.6%	3.4%	8.7%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae	0.8%	0.8%	1.1%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Parabacteroides	0.8%	0.8%	1.1%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae	1.1%	1.3%	2.5%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__S24-7	13.7%	10.3%	19.1%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae]	1.1%	0.0%	0.0%			
p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__[Paraprevotellaceae];g__[Prevotella]	1.1%	0.0%	0.0%			
p__Firmicutes	54.1%	62.6%	47.5%			
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae	4.0%	1.2%	4.1%			
p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Lactobacillaceae;g__Lactobacillus	4.0%	1.2%	4.1%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;Other	2.6%	1.1%	0.6%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__	6.7%	23.0%	14.9%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae	11.4%	5.5%	2.9%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__	11.3%	5.4%	2.9%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae	11.4%	13.7%	8.0%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;Other	1.9%	0.6%	0.3%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__	2.1%	8.6%	4.6%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__Dorea	1.9%	0.1%	0.1%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Lachnospiraceae;g__[Ruminococcus]	5.3%	3.7%	2.5%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Peptostreptococcaceae	1.0%	0.4%	0.2%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae	8.5%	14.4%	10.0%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__	5.1%	8.2%	5.3%			
p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Ruminococcaceae;g__Oscillospira	2.6%	5.1%	3.9%			
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae	6.4%	1.0%	5.1%			
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__	0.1%	1.0%	0.7%			
p__Firmicutes;c__Erysipelotrichi;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae;g__Allobaculum	6.3%	0.0%	4.4%			
p__Proteobacteria	3.8%	13.3%	10.8%			
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae	1.4%	2.2%	2.5%			
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__	0.0%	1.4%	1.9%			
p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__Desulfovibrio	1.4%	0.7%	0.4%			
p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae	1.3%	10.9%	8.2%			
p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae;g__	0.0%	10.8%	7.7%			
p__Proteobacteria;c__Epsilonproteobacteria;o__Campylobacteriales;f__Helicobacteraceae;g__Helicobacter	1.3%	0.0%	0.1%			
p__Verrucomicrobia	10.9%	6.8%	7.1%			

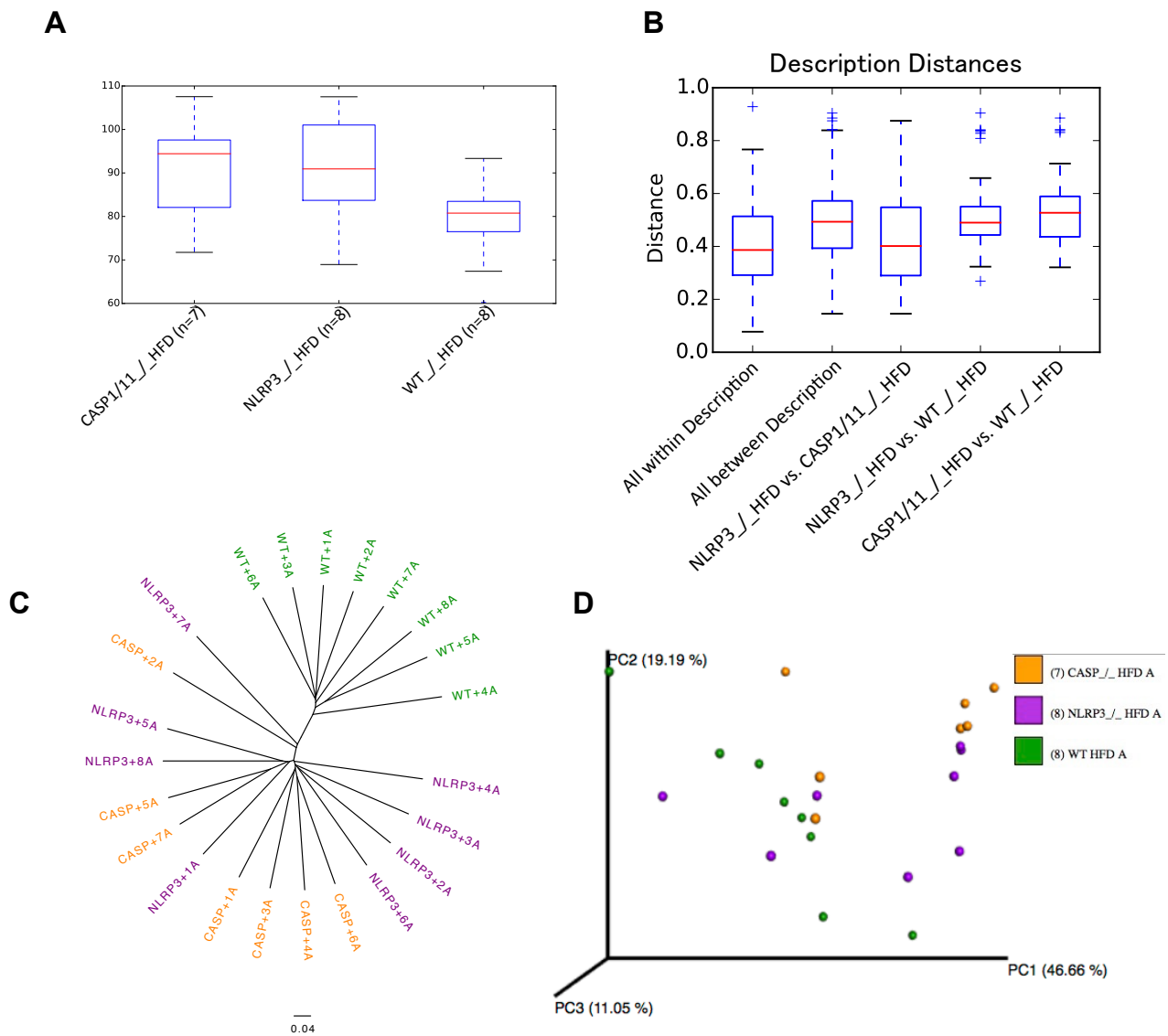
Também foram vistas outras modificações relacionadas à obesidade na microbiota desses animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, como o aumento da população de Proteobacterias, já observado nos animais de mesmo genótipos que foram alimentados com a dieta SFD, e a diminuição de bactérias com efeito benéfico para o hospedeiro como Actinobacteria e Verrucomicrobia (80,82,83).

A análise de sequenciamento de 16S rDNA é uma análise qualitativa e nos fornece dados quanto à diversidade e abundância dos grupos. Uma vez construída a tabela de OTU (*Operational Taxonomic Units*), existem diversos possíveis resultados. Foi analisada a diversidade alfa, que é usada para medir a diversidade dentro da amostra calculando-se um valor para cada amostra, através do gráfico de descrição *PD\_whole\_tree*, que mostra a riqueza e a abundância de espécies presentes em uma amostra considerando a proximidade filogenética dessas espécies (fig. 15A e 16A). Não houve diferença quanto ao número de espécies encontradas nos animais que receberam SFD (fig. 15A) ou HFD (fig. 16A).

Foi analisada também a diversidade beta, que compara as amostras e os grupos entre si, a diversidade beta fornece uma medida da distância ou dissimilaridade entre as amostras. No caso, como temos mais de duas amostras, a estatística é calculada para cada par de amostras para gerar uma matriz de distância (fig. 15B e 16B). Podemos observar que em ambos os tratamentos, os animais  $NLRP3^{-/-}$  apresentaram um distanciamento em relação aos animais controles, porém mais significativo com a dieta HFD (fig. 16B). Já os animais Caspase 1/11 $^{-/-}$  apresentaram um distanciamento em relação aos animais  $NLRP3^{-/-}$  quando alimentados com a dieta padrão (SFD) (fig. 15B) e em relação aos animais WT quando alimentados com a dieta HFD (fig. 16B).



**Figura 15:** Diversidade da composição filogenética da microbiota intestinal de animais selvagens (WT), Caspase 1/11 $^{-/-}$  e  $NLRP3^{-/-}$  submetidos à dieta normolipídica (SFD) por 3 meses. Diversidade alfa: descrição *PD\_whole\_tree* (A); diversidade beta: matriz de distância UniFrac ponderado (*weighted\_unifrac*) (B), árvore de diversidade UniFrac não ponderado (*unweighted\_unifrac*) (C) e PCoA plot de dispersão UniFrac não ponderado (*unweighted\_unifrac*).



**Figura 16:** Diversidade da composição filogenética da microbiota intestinal de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) por 3 meses. Diversidade alfa: descrição *PD\_whole\_tree* (A); diversidade beta: matriz de distância UniFrac ponderado (*weighted\_unifrac*) (B), árvore de diversidade UniFrac não ponderado (*unweighted\_unifrac*) (C) e PCoA plot de dispersão UniFrac não ponderado (*unweighted\_unifrac*).

Ainda, analisamos a diversidade beta por UniFrac não ponderado (*unweighted\_unifrac*), que usa a presença e ausência de OTUs e filogenia para comparar as amostras, mostrando o quão semelhantes essas amostras são quando comparadas as diversidades de espécies das amostras. A partir dessa análise, foi possível a construção da árvore de diversidade das amostras (fig. 15C e 16C), na qual é possível o agrupamento das amostras. Nota-se que os grupos de animais WT, em ambas as dietas, apresentaram uma total clusterização, o que não foi visto nos animais nocautes, mostrando que o genótipo tem uma importância na diversidade das amostras. Uma vez tratados com dieta HFD, os animais dos grupos de animais nocautes ficam ainda mais dispersos, mostrando mais uma vez que a dieta tem um papel diferente nos animais

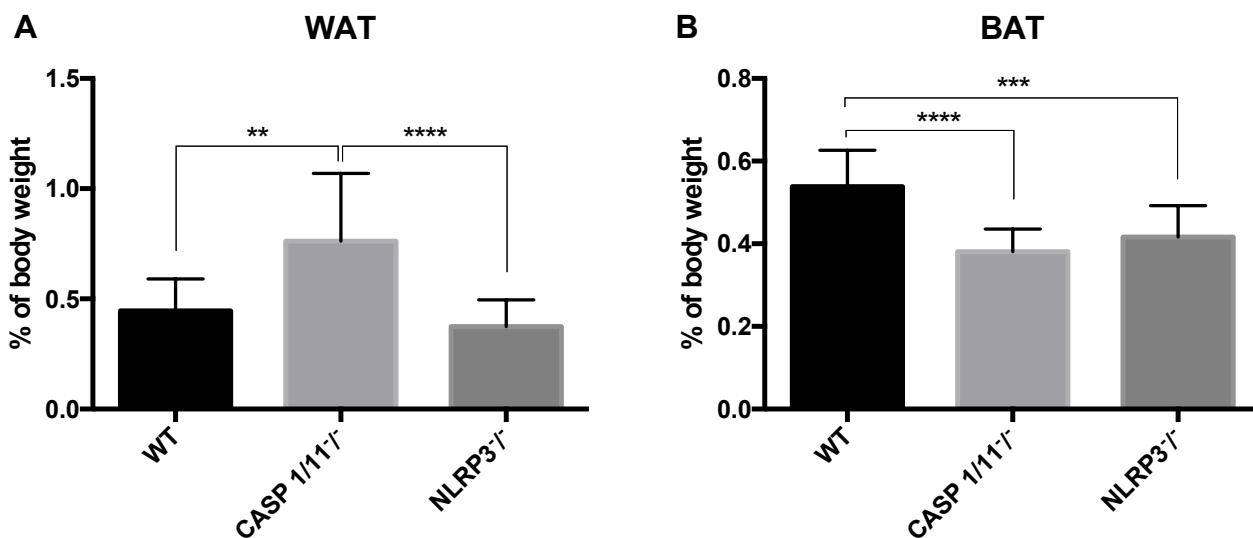
nocautes para proteínas do complexo NLRP3. Podemos observar uma maior dispersão das amostras nos grupos que receberam a dieta HFD (fig. 16D), com maior distanciamento dos grupos Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e WT, conforme já visto na figura 15B. Dos animais que receberam a dieta SFD, o maior distanciamento foi entre os grupos NLRP3<sup>-/-</sup> e WT.

## 5.2. Experimentos *ex vivo*

### 5.2.1. O inflamassoma NLRP3 modula a abundância dos tecidos adiposos

Os tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT) tem origens e funções diferentes. O BAT é um importante site de termogênese e o WAT se mostra como um depósito energético (84).

Constatado o diferente metabolismo energético e lipídico de animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>, investigamos a abundância desses tecidos em animais selvagens (WT) e nocautes para Caspase 1/11 e NLRP3.



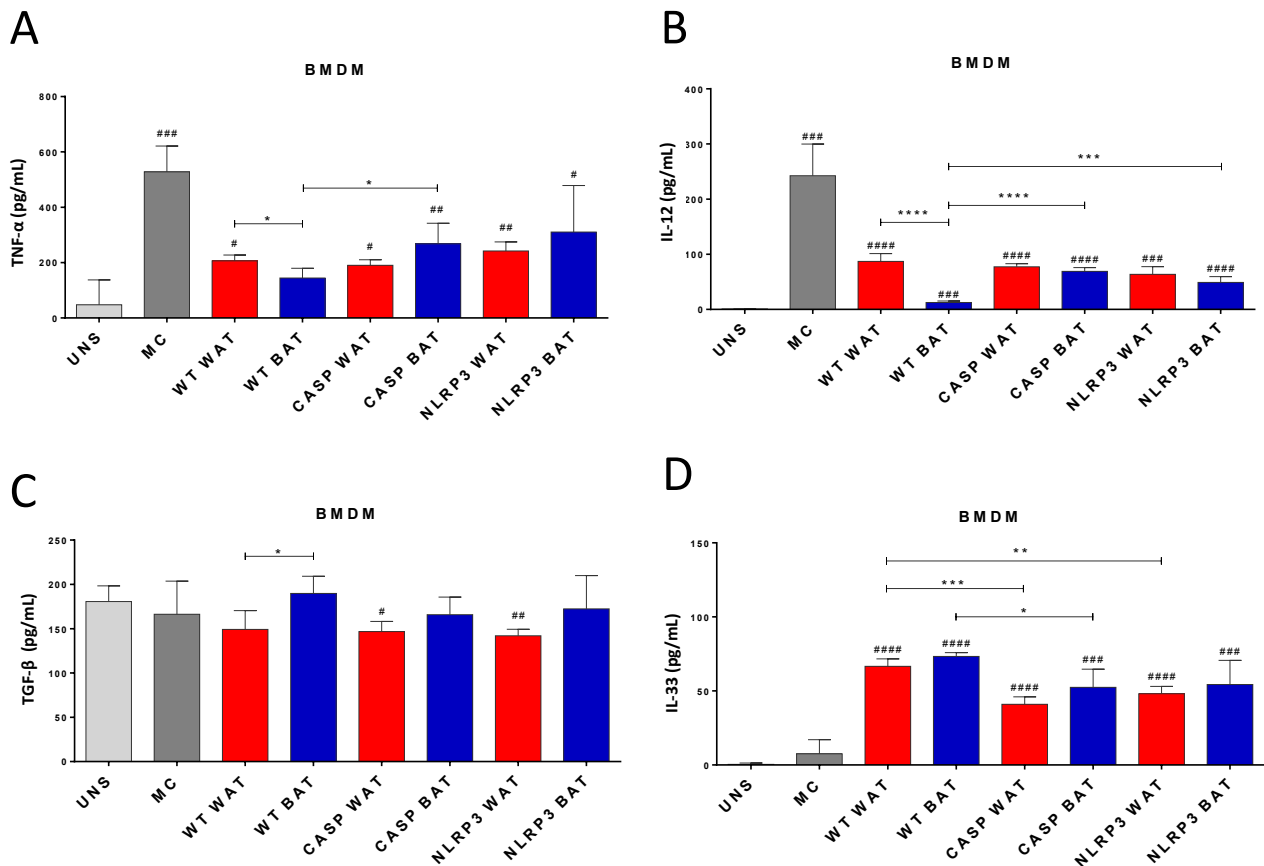
**Figura 17:** Peso do tecido adiposo branco (WAT) (A) e marrom (BAT) (B) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>. Tecidos retirados da tuba uterina (WAT) e intra-escapular (BAT). O peso dos tecidos está apresentado como porcentagem do peso do animal. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=13). Análise estatística realizada por Anova, onde (\*\*) representa p<0,01, (\*\*\*) representa p<0,005 e (\*\*\*\*) representa p<0,0001.

Foi observado um aumento do WAT nos animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> quando comparados aos animais WT e NLRP3<sup>-/-</sup>, enquanto há uma diminuição do BAT em ambos os grupos nocautes. Tendo o WAT papel conhecido na adipogênese e o BAT um papel protetor contra a obesidade.

### 5.2.2. O papel diferencial de adipócitos marrons e brancos na ativação de macrófagos

A inflamação proveniente do tecido adiposo é considerada uma das principais forças motrizes para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 em indivíduos obesos. As funções convencionais e específicas dos macrófagos presentes no tecido adiposo branco são ligadas a mudanças metabólicas e inflamatórias que ocorrem durante o desenvolvimento da obesidade (85).

Macrófagos podem compreender até 40% das células no tecido adiposo de obesos e podem ser divididos em duas classes, M1 (perfil pró-inflamatório) e M2 (perfil anti-inflamatório). Macrófagos M1, residentes do WAT de pessoas obesas, secretam mediadores pró-inflamatórios incluindo prostaglandina E2 (PGE2), IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , enquanto os macrófagos M2, induzidos por citocinas Th2, são distintos e funcionalmente associados à remodelação de tecidos e imunossupressão. Desta forma, os macrófagos desempenham um papel importante na inflamação do tecido adiposo (17).

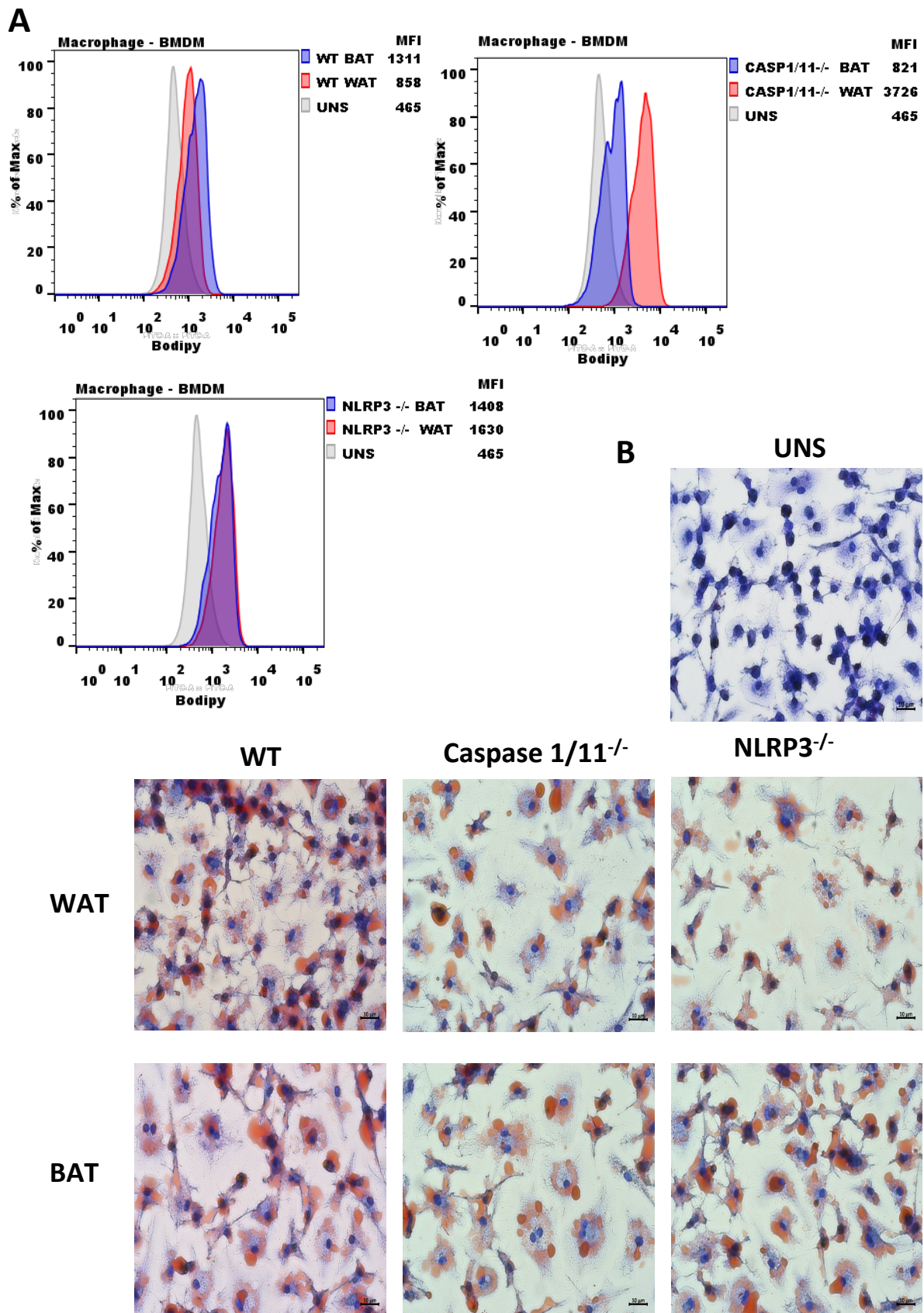


**Figura 18:** Quantificação de citocinas em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) cultivados por 24h com sobrenadantes de tecido adiposo (WAT e BAT) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>. As citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-12 (B), TGF- $\beta$  (C) e IL-33 (D) foram dosadas por ELISA. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=13). Análise estatística realizada por Anova, onde



onde (\*) representa  $p < 0,05$ , (\*\*) representa  $p < 0,01$ , (\*\*\*) representa  $p < 0,005$  e (\*\*\*\*) representa  $p < 0,0001$ ; (#) representa a diferença comparado ao não estimulado (UNS).

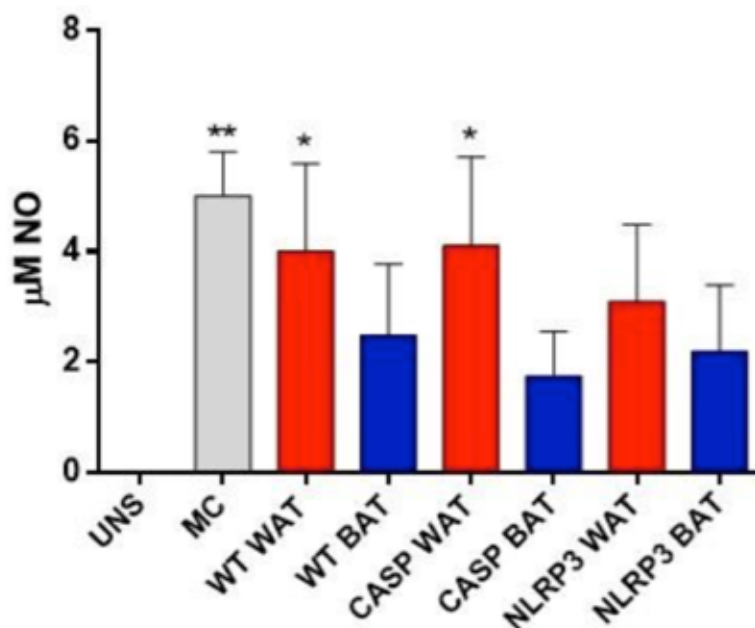
Foram dosadas as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (fig. 18A) e IL-12 (fig. 18B) e anti-inflamatórias TGF- $\beta$  (fig. 18C) e IL-33 (fig. 18D). As duas primeiras estão ligadas à polarização M1 e as demais à M2. Foi visto padrão semelhante entre as citocinas, TNF- $\alpha$  e IL-12 tiveram uma produção diminuída nos macrófagos estimulados com sobrenadantes de BAT em relação ao sobrenadante de WAT de animais WT; já a citocina TGF- $\beta$  apresentou um aumento nos macrófagos estimulados com sobrenadantes de BAT em relação ao sobrenadante de WAT de animais WT.



**Figura 19:** Biogênese de corpúsculo lipídico em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) cultivados por 24h com sobrenadantes de tecido adiposo (WAT e BAT) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>. A marcação foi feita com *Oil Red* (microscopia) (B) e sonda BODIPY (Citometria) (A). Os resultados estão expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI). A leitura foi feita por FACS no canal FITC/FL1.

O resultado mostra uma maior formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos derivados de medula óssea quando estimulados pelos produtos de secreção dos adipócitos (fig. 19). No estímulo de macrófagos de camundongos selvagens, foi observada uma maior formação de corpúsculos lipídicos quando estimuladas pelo tecido adiposo marrom, mostrando assim, a relação desse tecido na ativação celular visto que a biogênese de corpúsculos lipídicos marca ativação celular e estes são importantes sítios de síntese e armazenamento de mediadores inflamatórios lipídicos (67). O inflamassoma NLRP3 também tem um papel importante nesse processo, visto que quando o estímulo é depletado dos componentes do inflamassoma, a modulação muda: na ausência das caspases 1 e 11, as células estimuladas com o tecido adiposo marrom apresentaram maior biogênese de CLs; e na ausência da NLRP3 ambos os estímulos aumentaram a biogênese na mesma proporção.

Foi ainda dosado óxido nítrico (fig. 20). Os dados mostram que, comparado ao não estimulado, o tecido adiposo induz a produção de óxido nítrico, que é um marcador de ativação celular em macrófagos.



**Figura 20:** Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) cultivados por 24h com sobrenadantes de tecido adiposo (WAT e BAT) de animais selvagens (WT), Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>. Foi usado reagente de Greiss para a reação colorimétrica e a quantificação foi feita a partir de curva de concentração previamente conhecida. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão (n=8). Análise estatística realizada por Anova, onde (\*) representa  $p < 0,05$ , (\*\*) representa  $p < 0,01$  e (\*\*\*) representa  $p < 0,005$ .

Quando estimulados com os tecidos adiposos selvagens, houve maior produção de

óxido nítrico nos macrófagos estimulados com o tecido adiposo branco do que com o marrom, mostrando que o tecido adiposo branco está causando maior ativação celular nessas células. Esse padrão se repete quando os tecidos adiposos são nocauteados para os componentes do inflamassoma, o que sugere que o inflamassoma NLRP3 não participa ativamente dessa ativação.

## 6. Discussão

As caspases são uma família de proteases de cisteína intracelular que têm um papel importante na proliferação, inflamação e morte por apoptose (86). A caspase-1, também conhecida como enzima conversora de IL-1 $\beta$ , foi a primeira caspase a ser descoberta e foi originalmente caracterizada como o ativadora de as citocinas pró-inflamatórias de IL-1 $\beta$  e IL-18 (87). Já foi visto que a deficiência de IL-18 em camundongos conduz a hiperfagia, a resistência à insulina e obesidade (88), fato que pode estar associado aos nossos achados, onde animais depletados de caspase 1/11 tiveram o maior ganho de peso. Esse maior ganho de peso nos animais nocautes está também associado ao sexo e idade, animais machos nocautes para caspase-1, submetidos à dieta hiperlipídica (45% de gorduras), ganharam massa gorda extra após 16 semanas de tratamento, já as fêmeas demoraram 28 semanas; ainda, os machos nocautes atingiram um aumento de massa gorda mesmo com ração normolipídica (10% de gorduras) após 40 semanas (23). No presente estudo, com apenas fêmeas, todos os grupos que receberam dieta HFD apresentaram aumento de significativo de peso ( $\geq 30\%$  em relação ao grupo de mesmo genótipo com dieta SFD) após 15 semanas de tratamento; porém, apenas os animais nocautes para caspase 1/11 apresentaram um aumento do fígado, com presença de nível inicial de esteatose hepática, indicando uma possível disfunção do metabolismo lipídico.

A redução na expressão de NLRP3 no tecido adiposo de está associada com uma inflamação diminuída e melhora da sensibilidade à insulina em pacientes diabéticos obesos de tipo 2 (89). No mesmo estudo a ablação de NLRP3 impediu a ativação do inflamassoma induzida pela obesidade em depósitos de gordura e no fígado, juntamente com aumento na sinalização de insulina. Desta maneira, mostrando a importância do NLRP3 no desenvolvimento da obesidade, bem como na inflamação e resistência à insulina a ela associadas (89). A proteína ASC, necessária para a montagem e ativação dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, também já foi associada ao ganho de peso e à resistência à insulina. A ausência de ASC diminui o ganho de peso em animais machos submetidos à uma dieta HFD (60% de lipídeos) por 12 semanas, bem como aumentou a sensibilidade à insulina nesses animais, diminuindo os níveis séricos de glicose e insulina (90). De maneira semelhante, fêmeas nocautes para ASC e para NLRP3 alimentadas com HFD por 12 meses apresentaram uma significativa melhora na ação da insulina quando comparadas ao grupo controle, além de uma proteção às células pancreáticas (91).

Nossos dados vão de encontro aos trabalhos acima, uma vez que os animais NLRP3<sup>-/-</sup> e ASC<sup>-/-</sup> foram os que tiveram menor ganho de peso. Corroborando com a literatura, nossos achados mostram que animais nocautes para ASC e NLRP3 apresentaram um ganho de peso igual ou menor quando comparados aos animais selvagens após 15 semanas de tratamento com dieta HFD, diferente dos animais nocautes para caspase 1/11 e caspase 11, que apresentam um ganho de peso maior. A diferença no aumento de massa gorda nos animais fica evidente na figura 2, que mostra o acúmulo de tecido adiposo abdominal e visceral.

O acúmulo de gordura no fígado, ou esteatose hepática, pode ser causado por uso excessivo de álcool ou por uma ingestão de gorduras maior que o fígado é capaz de metabolizar, havendo assim uma deposição dessa gordura em macrovesículas nos hepatócitos (92). A esteatose provoca doenças metabólicas também ligadas à obesidade tais como a hipertensão, diabetes ou dislipidemia por afetar a resistência à insulina (93), e aumenta o risco de complicações cardíacas e mortalidade por doenças cardiovasculares (92). Em estudo recente, foi mostrada a necessidade de ativação do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento da esteatose hepática, camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> foram protegidos a longo prazo contra hepatomegalia, lesões hepáticas e infiltração de macrófagos ativados, quando comparados a animais selvagens (94). Isso poderia explicar a esteatose diminuída do grupo NLRP3<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD) comparada à esteatose do grupo WT ou Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD).

A relação de problemas cardiovasculares com a esteatose, apesar de bem estabelecida, se mantém não muito clara em relação aos mecanismos pelos quais ocorre. É possível que essa relação seja explicada pelo fato de a esteatose ser um marcador do distúrbio metabólico. Além disso, a esteatose por si só pode contribuir para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica (95), que poderia prejudicar o funcionamento cardiovascular. A prevalência de doença coronária, infarto do miocárdio e acidente cardiovascular são aproximadamente três vezes maior em indivíduos com síndrome metabólica do que naqueles sem síndrome (96).

Condizente com os dados anteriores, o grupo Caspase 1/11<sup>-/-</sup> submetidos à dieta hiperlipídica (HFD), que teve o maior ganho de peso e apresentou maior nível de esteatose hepática, apresentou uma maior biogênese de corpúsculo lipídico. Essa maior ativação celular pode estar ligada a uma compensação pela falta de IL-1 $\beta$  causada pela ausência de caspase 1, que foi intensificada com o aumento de peso e/ou dieta hiperlipídica.

Outros agentes importantes para o processo inflamatório são as espécies reativas, que levam ao dano celular e, conseqüentemente, ao estabelecimento da inflamação, um dos muitos mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 é através de ROS (97). Espécies reativas como ROS e NO são produzidas durante o metabolismo celular e indicam uma alta atividade. A biodisponibilidade do NO é diminuída na obesidade e resistência à insulina, bem como o aumento nos níveis de NO tem efeitos sobre a obesidade e diabetes (98). No presente trabalho, animais nocautes para a proteína NLRP3, que tiveram o menor ganho de peso após a dieta HFD, apresentaram uma produção exacerbada de ROS comparado aos animais selvagens, bem como uma alta produção de NO.

Também ligada à inflamação e obesidade, a microbiota intestinal apresenta-se como uma chave na modulação da obesidade, bem como dos possíveis danos causados pela síndrome metabólica. Determinados filos presentes no intestino podem modular o metabolismo a partir de seus metabólitos lançados no corpo, bem como gerar uma inflamação sistêmica através da perda da barreira intestinal e a entrada de microorganismos e LPS na corrente sanguínea.

As Proteobacterias produzem álcool e estão substancialmente aumentadas em pacientes com esteatose. Foi visto que o aumento da abundância de bactérias produtoras de álcool na microbiota de pacientes com NASH (6,03%), bem como a elevação da concentração de etanol no sangue desses pacientes com NASH; o papel bem estabelecido do metabolismo do álcool no estresse oxidativo e, conseqüentemente, a inflamação do fígado sugerem um papel para a microbiota produtora de álcool na patogênese de NASH (99). Nossos resultados de análise filogenética mostram que os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, que apresentaram esteatose hepática, apresentaram também os maiores níveis de proteobactérias, chegando ao dobro do encontrado nos demais grupos que receberam a mesma dieta.

A relação entre a razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) e a obesidade já está bem estabelecida. Em estudo usando animais ob/ob e diferentes dietas, foi observado o aumento da razão F/B nos animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica, mas a comparação com animais WT que receberam a mesma ração mostrou que os resultados eram principalmente pela dieta rica em lipídeos e não pela obesidade genética (100); o que nos leva a concluir que, apesar do fator genético influenciar na diversidade e abundância da microbiota intestinal, a dieta hiperlipídica agiu como fator intensificador e decisivo para a distribuição filogenética da microbiota intestinal desses animais.

O acúmulo de gordura no tecido adiposo, bem como a infiltração de células

imunológicas nesse tecido, estão intimamente ligados à ativação do inflamassoma, com liberação de citocinas, e com o estabelecimento da inflamação sistêmica crônica presente na obesidade.

O tecido adiposo branco reconhecido como um importante órgão endócrino metabolicamente ativo (9) e é responsável por regular o balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise (5). No desenvolvimento de obesidade, as células de gordura aumentada produzem e liberam fatores paracrinos proliferativos como controladores internos da proliferação de pré-adipócitos e sua resposta proliferativa é modulada por estímulos neurais ao tecido adiposo e / ou aos fatores séricos. Em todos os casos, os fatores paracrinos parecem desempenhar um papel fundamental. O tecido adiposo é responsável pela secreção de diversas citocinas e adipocinas (IGF I, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônias de macrófagos (MCSF), angiotensina II, ácido autotaxin-lisofosfatídico (ATX-LPA), leptina, resistina) que podem ter ação local ou sistêmica e implicam na modulação da adipogênese (9).

Já o BAT pode proteger contra a obesidade por causa da sua atividade termogênica. Os seus processos termogênicos ocorrem através de uma propriedade bioquímica única das mitocôndrias em adipócitos marrons, em que a proteína desacopladora-1 (UCP1), desacopla fisiologicamente a cadeia respiratória (101). Estudos experimentais em roedores mostraram que a termogênese induzida pela dieta em BAT possa proteger contra a obesidade. Ablação de BAT e silenciamento do gene que codifica a UCP1 demonstraram sensibilizar os organismos para a obesidade em vários contextos experimentais (102), enquanto que os modelos genéticos de obesidade *ob/ob* mostram frequentemente inibição anormal da atividade BAT (8).

Animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> apresentam, de forma constitutiva, um aumento do WAT e uma diminuição do BAT. Essa característica pode estar ligada à maior tendência ao ganho de peso; mais que isso, mostra que essas importantes proteínas para o processo inflamatório estão modulando a abundância dos diferentes tecidos adiposos.

Os macrófagos, células imunológicas que também estão infiltradas no tecido adiposo, estão associadas ao estabelecimento da inflamação nesse tecido e podem assumir características anti ou pró-inflamatórias, de acordo com a polarização assumida. Uma vez estimulados com sobrenadante de WAT, os macrófagos tiveram uma maior secreção de TNF- $\alpha$  e IL-12, citocinas pró-inflamatórias; mas quando estimuladas com sobrenadante do BAT, houve um aumento de TGF- $\beta$ , citocina anti-inflamatória. Corroborando com a ideia de que o WAT induz um ambiente pró-inflamatório e o BAT, anti-inflamatório. Uma vez utilizados para estímulo WAT e BAT de animais Caspase



1/11<sup>-/-</sup>, o perfil de secreção dos macrófagos é modificado, mostrando que o inflamassoma NLRP3 tem papel fundamental na ativação desses macrófagos.

De maneira semelhante, a biogênese de corpúsculo lipídico, também associado à ativação celular, se mostra diferente nos macrófagos estimulados com sobrenadante de WAT ou BAT e na presença ou ausência de proteínas do inflamassoma nesses tecidos. Isso mostra o papel do inflamassoma NLRP3 neste processo, pois quando as células são estimuladas por sobrenadantes de adipócitos depletados das proteínas caspase 1 e 11 e NLRP3 do inflamassoma, a indução da biogênese de corpúsculo segue um padrão diferente. Sendo assim, o tecido adiposo tem um papel na ativação celular de macrófagos, e mais, há a participação do inflamassoma NLRP3 neste processo. Além disso, o BAT induz uma maior ativação quando comparado ao WAT.

Em conjunto, os resultados indicam que WAT e BAT podem modular de maneira diferente a ativação de macrófagos. BAT aumenta o teor de lipídios intracelulares e WAT aumenta a produção de óxido nítrico, mostrando diferentes sinais de ativação devido a diferentes estímulos. Em adição, a análise observada usando tecido knockout NLRP3 sugere que este complexo desempenha um papel importante na ativação de macrófagos regulada pelo tecido adiposo.

## 7. Conclusão

- O inflamassoma NLRP3, principalmente as caspases 1 e 11, tem um importante papel no estabelecimento da obesidade
  - o Animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> tiveram um aumento no ganho de peso após tratamento com dieta HFD em relação aos demais grupos com o mesmo tratamento, com sinais de síndrome metabólica: cardiomegalia, hepatomegalia e esteatose, maior biogênese de corpúsculos lipídicos, logo uma maior atividade celular.
  - o Independentemente da obesidade, os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> apresentaram aumento de moléculas apresentadores de antígenos lipídicos (CD1d) em células do lavado peritoneal.
  - o Os animais obesos ASC<sup>-/-</sup> também apresentaram hepatomegalia e glicemia de jejum alterada.
  - o Os animais obesos NLRP3<sup>-/-</sup> tiveram um aumento do estresse oxidativo através da maior produção de ROS e NO, demonstrando um aumento da atividade celular.
- A análise lipidômica dos fígados dos animais mostraram uma maior clusterização nos grupos de animais obesos, indicando uma maior diversidade lipídica e de metabólitos entre os grupos e uma maior homogeneidade entre os animais do mesmo grupo.
- A ausência de Caspase 1/11 e do NLRP3 modulou a composição da microbiota e a dieta hiperlipídica intensificou essa modulação
  - o Havia uma diversidade das populações de bactérias nos diferentes genótipos, essa diversidade foi aumentada nos animais obesos, diminuindo a distância entre os grupos.
  - o Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> não obesos, que apresentaram hepatomegalia, apresentaram maior abundância de Proteobacterias), filo relacionados com a esteatose.
  - o Os animais Caspase 1/11<sup>-/-</sup> obesos, que tiveram o maior ganho de peso, apresentaram a maior razão entre Firmicutes/Bacteroidetes, relacionada com a obesidade
- O inflamassoma NLRP3 influencia a distribuição dos tecidos adiposos
  - o Animais depletados para as proteínas do inflamassoma tiveram um aumento do tecido adiposo branco (Caspase 1/11<sup>-/-</sup>) e uma diminuição do marrom (Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup>).

- O inflamassoma NLRP3, bem como os diferentes tipos de tecidos adiposos, também possui papel no processo de ativação dos macrófagos
  - o Células estimuladas por sobrenadantes de BAT aumentaram a biogênese de CL em relação às estimuladas com WAT, uma vez os tecidos depletados para as proteínas do inflamassoma, essa relação é invertida, principalmente Caspase 1/11.
  - o O WAT induz uma maior produção de NO nos macrófagos, independentemente do inflamassoma NLRP3.
  - o Citocinas pró-inflamatória são mais secretadas por células estimuladas com sobrenadante de WAT, esse perfil é modificado para uma maior produção nas células estimuladas com BAT quando os sobrenadantes são de tecidos Caspase 1/11<sup>-/-</sup> (TNF- $\alpha$  e IL-12) e NLRP3<sup>-/-</sup> (IL-12); citocinas anti-inflamatórias tem uma maior secreção por células estimuladas por BAT (TGF- $\beta$ ) e, de maneira semelhante, é aumentada para WAT quando o tecido adiposo é depletado para Caspase 1/11<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> (IL-33). Sugerindo que o complexo NLRP3 desempenha um papel importante na ativação de macrófagos regulada pelo tecido adiposo.
- WAT e BAT, bem como os exossomos por eles secretados, tem papel na modulação dos parâmetros carcinogênicos do câncer de mama
  - o Ambos os adipócitos induziram nas células tumorais um aumento na viabilidade celular e do ciclo celular.
  - o A ativação das células tumorais é maior quando estimuladas com sobrenadante de WAT, tendo um aumento da produção de espécies reativas (NO e ROS) e da biogênese de CL pelas 4T1, uma vez retirados os exossomos, as células se tornam mais ativadas com o estímulo de BAT.

## 8. Referências bibliográficas

1. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health* (2014)176. doi:ISBN 9789241564854
2. WHO. WHO | Overweight and obesity. *WHO* (2017) Available at: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/) [Accessed September 20, 2017]
3. Park Y-W, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* (2003) **163**:427–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3146257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 15, 2015]
4. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* (2016) **375**:794–798. doi:10.1056/NEJMSr1606602
5. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch Med Res* (2008) **39**:715–728. doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005
6. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* (2009) **360**:1509–17. doi:10.1056/NEJMoa0810780
7. Frontini A, Cinti S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metab* (2010) **11**:253–256. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004
8. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* (2009) **23**:3113–3120. doi:fj.09-133546 [pii]r10.1096/fj.09-133546
9. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* (2001) **60**:329–339. doi:10.1079/PNS200194
10. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* (2012) **18**:363–74. doi:10.1038/nm.2627

11. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* (2008) **49**:1562–8. doi:10.1194/jlr.M800019-JLR200
12. Subbaramaiah K, Howe LR, Bhardwaj P, Du B, Gravaghi C, Yantiss RK, Zhou XK, Blaho VA, Hla T, Yang P, et al. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. *Cancer Prev Res (Phila)* (2011) **4**:329–46. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0381
13. Morris PG, Hudis CA, Giri D, Morrow M, Falcone DJ, Zhou XK, Du B, Brogi E, Crawford CB, Kopelovich L, et al. Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* (2011) **4**:1021–9. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110
14. Shapiro H, Pecht T, Shaco-Levy R, Harman-Boehm I, Kirshtein B, Kuperman Y, Chen A, Blüher M, Shai I, Rudich A. Adipose tissue foam cells are present in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) **98**:1173–81. doi:10.1210/jc.2012-2745
15. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* (2003) **278**:37041–51. doi:10.1074/jbc.M305213200
16. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* (2006) **116**:3015–25. doi:10.1172/JCI28898
17. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* (2007) **117**:175–84. doi:10.1172/JCI29881
18. Subbaramaiah K, Morris PG, Zhou XK, Morrow M, Du B, Giri D, Kopelovich L, Hudis CA, Dannenberg AJ. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. *Cancer Discov* (2012) **2**:356–65. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0241
19. Samarajeewa NU, Yang F, Docanto MM, Sakurai M, McNamara KM, Sasano H, Fox SB, Simpson ER, Brown KA. HIF-1 $\alpha$  stimulates aromatase expression driven by prostaglandin E2 in breast adipose stroma. *Breast Cancer Res* (2013) **15**:R30. doi:10.1186/bcr3410
20. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* (2010) **140**:821–832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040

21. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* (2011) **29**:707–35. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405
22. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlari T, Hornung V. Inflammasomes: Current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* (2011) **68**:765–783. doi:10.1007/s00018-010-0567-4
23. Wang H, Capell W, Yoon JH, Faubel S, Eckel RH. Obesity development in caspase-1-deficient mice. *Int J Obes (Lond)* (2013)1–4. doi:10.1038/ijo.2013.59
24. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, Rensen PCN, Voshol PJ, Fantuzzi G, Hijmans A, et al. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. *Cell Metab* (2010) **12**:593–605. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.011
25. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Review series Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* (2006) **116**:1793–1801. doi:10.1172/JCI29069.and
26. Koppe SWP. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. *Transl Res* (2014) **164**:312–322. doi:10.1016/j.trsl.2014.06.008
27. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley K V., Chalasani N, Lavine JE, Ratziu V, McCullough A. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (2011) **54**:344–353. doi:10.1002/hep.24376
28. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* (2011) **140**:124–131. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.038
29. Thamer C, Machann J, Haap M, Stefan N, Heller E, Schnödt B, Stumvoll M, Claussen C, Fritsche A, Schick F, et al. Intrahepatic lipids are predicted by visceral adipose tissue mass in healthy subjects. *Diabetes Care* (2004) **27**:2726–9. doi:10.2337/DIACARE.27.11.2726
30. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z, Ruderman N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* (2005) **54**:3458–65. doi:10.2337/DIABETES.54.12.3458
31. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* (2005) **11**:183–190. doi:10.1038/nm1166

32. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* (2010) **42**:320–330. doi:10.1016/j.dld.2010.01.016
33. Maurice CF. Book Review A Gut Feeling about You. *Cell* (2015) **163**:785. doi:10.1016/j.cell.2015.10.053
34. Joyce SA, Gahan CGM. The gut microbiota and the metabolic health of the host. *Curr Opin Gastroenterol* (2014) **30**:120–127. doi:10.1097/MOG.0000000000000039
35. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* (2014) **157**:121–141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
36. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* (2016) **16**:341–352. doi:10.1038/nri.2016.42
37. Huttenhower C, Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* (2012) **486**:207–14. doi:10.1038/nature11234
38. Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* (80- ) (2005) **308**:1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
39. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* (2015) **14**:20–32. doi:10.1038/nrmicro3552
40. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* (2016) **164**:337–340. doi:10.1016/j.cell.2016.01.013
41. O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* (2006) **7**:688–693. doi:10.1038/sj.embor.7400731
42. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* (2005) **41**:422–433. doi:10.1002/hep.20632
43. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* (2007) **13**:1324–1332. doi:10.1038/nm1663
44. Dapito DH, Mencin A, Gwak G-Y, Pradere J-P, Jang M-K, Mederacke I, Caviglia JM, Khiabanian H, Adeyemi A, Bataller R, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* (2012) **21**:504–16. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.007
45. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* (2013) **499**:97–101.

doi:10.1038/nature12347

46. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* (2013) **13**:800–812. doi:10.1038/nrc3610
47. Chen GY, Shaw MH, Redondo G, Nunez G. The Innate Immune Receptor Nod1 Protects the Intestine from Inflammation-Induced Tumorigenesis. *Cancer Res* (2008) **68**:10060–10067. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2061
48. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, Yu G-Y, Osterreicher CH, Hung KE, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* (2012) **491**:254–8. doi:10.1038/nature11465
49. Garaude J, Kent A, van Rooijen N, Blander JM. Simultaneous Targeting of Toll- and Nod-Like Receptors Induces Effective Tumor-Specific Immune Responses. *Sci Transl Med* (2012) **4**:120ra16-120ra16. doi:10.1126/scitranslmed.3002868
50. Pradere J-P, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene* (2014) **33**:3485–3495. doi:10.1038/onc.2013.302
51. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med* (2009) **1**:6ra14-6ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3000322
52. Kishino S, Takeuchi M, Park S-B, Hirata A, Kitamura N, Kunisawa J, Kiyono H, Iwamoto R, Isobe Y, Arita M, et al. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci* (2013) **110**:17808–17813. doi:10.1073/pnas.1312937110
53. Huebner SM, Olson JM, Campbell JP, Bishop JW, Crump PM, Cook ME. Dietary trans-10,cis-12 CLA reduces murine collagen-induced arthritis in a dose-dependent manner. *J Nutr* (2014) **144**:177–184. doi:10.3945/jn.113.182550
54. Miyamoto J, Mizukure T, Park SB, Kishino S, Kimura I, Hirano K, Bergamo P, Rossi M, Suzuki T, Arita M, et al. A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J Biol Chem* (2015) **290**:2902–2918. doi:10.1074/jbc.M114.610733
55. Yang HE, Li Y, Nishimura A, Jheng HF, Yuliana A, Kitano-Ohue R, Nomura W, Takahashi N, Kim CS, Yu R, et al. Synthesized enone fatty acids resembling metabolites from gut microbiota suppress macrophage-mediated inflammation in adipocytes. *Mol Nutr Food Res* (2017)1700064. doi:10.1002/mnfr.201700064



56. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* (2007) **56**:1761–1772. doi:10.2337/db06-1491
57. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* (2008) **57**:1470–1481. doi:10.2337/db07-1403
58. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell Metab* (2015) **22**:658–668. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.026
59. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (2009) **49**:1877–1887. doi:10.1002/hep.22848
60. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* (2009) **457**:480–484. doi:10.1038/nature07540
61. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* (2013) **57**:601–609. doi:10.1002/hep.26093
62. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* (1993) **123**:1939–1951.
63. Gong H, Tan H, Fang N, Song T, Li S, Zhong M, Zhang W, Zhang Y. Impaired left ventricular systolic and diastolic function in patients with metabolic syndrome as assessed by strain and strain rate imaging. *Diabetes Res Clin Pract* (2009) **83**:300–307. doi:10.1016/j.diabres.2008.10.018
64. Magalhães KG, Almeida PE, Atella GC, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto HC, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Bozza MT, Bozza PT. Schistosomal-Derived Lysophosphatidylcholine Are Involved in Eosinophil Activation and Recruitment through Toll-Like Receptor–2–Dependent Mechanisms. *J Infect Dis* (2010) **202**:1369–1379. doi:10.1086/656477
65. Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* (2006) **55**:342–348.

doi:10.1007/s00011-006-5205-0

66. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan Q-W, Miyoshi H, Mashek DG. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest* (2011) **121**:2102–2110. doi:10.1172/JCI46069
67. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* (2009) **1791**:540–551. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005
68. Zeng Z. Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove. *Science* (80- ) (1997) **277**:339–345. doi:10.1126/science.277.5324.339
69. Brigl M, Brenner MB. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu Rev Immunol* (2004) **22**:817–90. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608
70. Huh JY, Kim JI, Park YJ, Hwang IJ, Lee YS, Sohn JH, Lee SK, Alfadda AA, Kim SS, Choi SH, et al. A novel function of adipocytes in lipid antigen presentation to iNKT cells. *Mol Cell Biol* (2013) **33**:328–39. doi:10.1128/MCB.00552-12
71. Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* (1995) **54**:505–510. doi:10.1136/ard.54.6.505
72. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* (2010) **10**:210–215. doi:10.1038/nri2725
73. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* (1999) **81**:185–8. doi:10.1136/ad.81.2.185
74. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:7265–70. doi:10.1073/pnas.1133870100
75. Hotamisligil GS, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* (1997) **389**:610–614. doi:10.1038/39335
76. Nam H, Ferguson BS, Stephens JM, Morrison RF. Impact of obesity on IL-12 family gene expression in insulin responsive tissues. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1832**:11–9. doi:10.1016/j.bbadis.2012.08.011
77. Schreyer SA, Chua SC, LeBoeuf RC. Obesity and diabetes in TNF- $\alpha$  receptor-deficient mice. *J Clin Invest* (1998) **102**:402–411. doi:10.1172/JCI2849
78. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, et al. A core gut microbiome in obese and lean

- twins. *Nature* (2009) **457**:480–484. doi:10.1038/nature07540
79. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* (2008) **3**:213–223. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
80. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin T V, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* (2015) **64**:872–883. doi:10.1136/gutjnl-2014-307142
81. Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, Raskin I. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome. *Diabetes* (2015) **64**: Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/64/8/2847> [Accessed September 13, 2017]
82. Zhang Y, Zhang H. Microbiota associated with type 2 diabetes and its related complications. *Food Sci Hum Wellness* (2013) **2**:167–172. doi:10.1016/j.fshw.2013.09.002
83. Ghouri YA, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPont AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* (2014) **7**:473–487. doi:10.2147/CEG.S27530
84. Giralt M, Villarroya F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* (2013) **154**:2992–3000. doi:10.1210/en.2013-1403
85. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* (2016) **59**:879–894. doi:10.1007/s00125-016-3904-9
86. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* (2009) **284**:21777–21781. doi:10.1074/jbc.R800084200
87. Fantuzzi G, Dinarello C a. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* (1999) **19**:1–11. doi:10.1023/A:1020506300324
88. Netea MG, Joosten L a B, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, Tack CJ, van Krieken H, Kim S-H, Stalenhoef AF, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med* (2006) **12**:650–656. doi:10.1038/nm1415
89. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL,

- Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* (2011) **17**:179–88. doi:10.1038/nm.2279
90. Boini KM, Xia M, Abais JM, Li G, Pitzer AL, Gehr TWB, Zhang Y, Li P-L. Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: Effects of ASC gene deletion and silencing. *Biochim Biophys Acta* (2014) **1843**:836–45. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.033
91. Youm Y-H, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* (2011) **152**:4039–45. doi:10.1210/en.2011-1326
92. López-Velázquez JA, Silva-Vidal K V., Ponciano-Rodríguez G, Chávez-Tapia NC, Arrese M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol* (2014) **13**:166–178.
93. Krishan S. Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* (2016)1–5. doi:10.1016/j.dsx.2016.01.034
94. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med* (2014) **92**:1069–1082. doi:10.1007/s00109-014-1170-1
95. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World J Gastroenterol* (2014) **20**:12956–12980. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12956
96. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* (2001) **24**:683–9. doi:10.2337/DIACARE.24.4.683
97. Latz E, Ts X, Stutz A. Display Settings: Activation and regulation of the inflammasomes . (2013) **13**:23702978. doi:10.1038/nri3452.Activation
98. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* (2014) **73**:383–99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016
99. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, Gill SR. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* (2013) **57**:601–609. doi:10.1002/hep.26093
100. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O’Sullivan O, Fouhy F, Clarke SF,

- O'Toole PW, Quigley EM, Stanton C, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* (2010) **59**:1635–1642. doi:10.1136/gut.2010.215665
101. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1831**:1533–41. doi:10.1016/j.bbaliip.2013.02.010
102. CANNON B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* (2004) **84**:277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003

## 9. Anexos

## Anexo I

A tabela abaixo mostra a composição das dietas usadas no experiment *in vivo*, sendo: a ração controle ou dieta AIN-93M ou *standard fat diet* (SFD), e a ração hiperlipídica ou dieta AIN-93M com 45% de lipídeos ou *high fat diet* (HFD).

Componentes	g/Kg de ração controle	g/Kg de ração hiperlipídica
Amido de milho	397,474	279,521
Amido de milho dextrinizado	131,996	131,996
Sacarose	99,997	0,000
Celulose	49,998	49,998
Caseína	199,994	178,240
Óleo de soja	69,998	174,410
Manteiga (80% de gordura)	0,000	145,342
Leite condensado	0,000	133,714
Mistura mineral	34,999	34,999
Mistura vitamínica	10,000	10,000
L-cistina	3,000	3,000
Bitartarato de colina	2,500	2,500
Hidroquinona	0,014	0,014

## Anexo II

Brasília, 02 de julho de 2014.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**ESTUDO DO PAPEL DO METABOLISMO LIPÍDICO, INFLAMAÇÃO E RESPOSTA IMUNE INATA NA OBESIDADE E NO CÂNCER DE MAMA.**", UnBDOC n.º 52306/2014, sob responsabilidade da Professora Kelly Grace Magalhães foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



  
Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
Coordenador da CEUA

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.