



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia – IB
Departamento de Biologia Celular - CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

O papel dos inflamassomas na disfunção metabólica: impacto na comunicação entre adipócitos e macrófagos

Dalila Juliana Silva Ribeiro

Brasília
Agosto 2021



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia – IB

Departamento de Biologia Celular - CEL

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

O papel dos inflamassomas na disfunção metabólica: impacto na comunicação entre adipócitos e macrófagos

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutora

Aluna: Dalila Juliana Silva Ribeiro
Orientadora: Prof. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília
Agosto 2021

Nome: Dalila Juliana Silva Ribeiro

Título: O papel dos inflamassomas na disfunção metabólica: impacto na comunicação entre adipócitos e macrófagos.

Banca Examinadora

Prof Dra. Kelly Grace Magalhães
Universidade de Brasília

Prof Dr. Prof. Dr. Marcelo Brigido
Universidade de Brasília

Prof Dr. Pedro Vieira
Universidade Estadual de Campinas

Prof Dr. Marcelo Mori
Universidade Estadual de Campinas

Prof Dra. Cecília Favali
Universidade de Brasília

*“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralizing event
created by the man something apart of real life,
and which must be cautiously guarded
and kept separate from everyday existence.
But science and everyday life cannot and
should not be separated.
Science, for me, gives a partial explanation of life. “*

Rosalind Franklin

*“Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Elas são coadjuvantes, não melhor, figurantes
Que nem devia tá aqui
Permita que eu fale, e não as minhas cicatrizes
Tanta dor rouba nossa voz, sabe o que resta de nós?
Alvos passeando por ai
Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Se isso é sobre vivência, me resumir à sobrevivência
É roubar um pouco de bom do que vivi
Permita que eu fale, não as minhas cicatrizes
Achar que essas mazelas me definem é o pior dos crimes”*

AmarElo – Emicida (part. Majur e Pabllo Vitar)

*“O encanto no silêncio das palavras não ditas”
- Catarina*

Projeto Herdeiros – Deuses Esquecidos
Dan Medeiros

Dedico este trabalho a pessoa que talvez
esteja mais feliz do que eu com essa conquista,
minha mãe, Maria das Dores Silva.
Mãe solo, que batalhou muito na vida
e sempre fez de tudo
para que eu nunca enfrentasse o que ela passou.
Sendo a maior incentivadora dos meus sonhos,
não existe outra escolha se não ela.

Este trabalho também é dedicado
a todos cientistas que enfrentam/enfrentaram desafios
relacionados a saúde mental ao longo de suas carreiras.

Agradecimentos - Brasil

À Universidade de Brasília (UnB), instituição de ensino superior pública com ciência e ensino da mais alta qualidade. Local que se tornou minha segunda casa desde 2012 quando ingressei no Bacharel em Biotecnologia e segui por toda minha formação acadêmica. Ser parte dessa comunidade tão rica e plural me transformou de todas as maneiras possíveis e sempre terei orgulho desse lugar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília e à CAPES pela estrutura física e financeira necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Kelly Grace Magalhães, pela oportunidade de ingressar em seu laboratório mais de oito anos atrás. Tenho certeza que a aluna do segundo semestre de citologia não tinha dimensão de tudo que estaria pela frente ao depois de se encantar com suas aulas ter tomado coragem para pedir um estágio. Obrigada pela confiança, paciência e ensinamentos ao longo de toda essa trajetória. Ter sido orientada por uma cientista mulher que luta por seu espaço mesmo quando o sistema não nos favorece sempre foi uma grande fonte de inspiração. Sempre guardarei com carinho momentos especiais e de aprendizados relacionados ou não com ciência que são fruto dessa relação.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia e Inflamação da Universidade de Brasília. Foi dentro desse laboratório cercada por tantos que por ali passaram que eu aprendi o que é fazer ciência. Dos momentos de pura frustração aos picos de euforia e alegria uma coisa sempre foi clara desde o início, não se constrói nada sozinha na ciência. Não poderia deixar de agradecer alguns integrantes que contribuíram avidamente com a construção desse trabalho e a minha formação. Nathália e Gabriel “meus alunos de IC”, espero que eu tenha sido capaz de contribuir com vocês tanto quanto vocês foram comigo. Obrigada por vestirem a camisa de colaboradores e se dedicarem a fundo nesse projeto até quando eu estava longe. Vocês são cientistas incríveis e pessoas muito especiais, tenho apenas carinho e orgulho.

À Raquel, companheira de projetos, bancada, congressos, experimentos absurdamente gigantes e definitivamente a maior latifundiária de espaços da geladeira. Nossa relação única ao longo de todos esses anos sempre foi muito especial pra mim e fonte de muita aprendizagem, dentro e fora da ciência. Igor e Pasqua, vocês que além da ajuda prática sempre contribuíram deixando o dia mais leve e divertido. Sabrina, por sempre tentar me dar um boost de auto estima e me fazer refletir. Obrigada por todas as conversas, lanches, ajuda, carinho, mais lanches e companheirismo ao longo de todos esses anos.

Ao Rafael, amigo, eu nunca vou conseguir expressar minha gratidão e carinho a você que é como um irmão pra mim. Você foi meu maior parceiro dentro do lab, você cuidou de mim e estive do meu lado me segurando quando eu só queria desistir. Você vai para sempre ter marcado o meu caminho na ciência e muito mais importante na vida como um todo.

Muito obrigada também à Lívia, Gabriella, Heloísa, Milena, Ana Júlia e Débora. Sendo orgulhosamente da geração F2, vi muita gente entrar e sair desse laboratório, eu mesma estou fisicamente longe há dois anos, e cada um sempre deixa sua marca, fica aqui meu muito obrigada e votos de felicidade e torcida para que o LIMI continue sendo essa potência em produzir ciência de qualidade no Brasil.

A todos os professores e professoras da UnB que de alguma forma contribuíram com minha formação acadêmica desde a graduação de Biotecnologia, mestrado e agora o doutorado. Em especial a Nádia Parachin, que apesar de atuar em um tema diferente sempre me ajudou e incentivou na busca de diferentes oportunidades. É incrível perceber que conselhos que você deu anos atrás passaram a fazer cada vez mais sentido. Você é uma inspiração profissional, mas fico ainda mais feliz com a nossa amizade.

Aos servidores da UnB, que são insubstituíveis no funcionamento da universidade. Em especial ao Chiquinho, técnico do nosso corredor que literalmente sempre nos salva. E à Lu que sempre arrumou com muita paciência e boa vontade meus problemas burocráticos na secretaria.

Aos colaboradores da Universidade de São Paulo presentes nesse trabalho, Prof Dr. Dario Zamboni e Prof Dr. Niels Câmara. E também ao Matheus que depois de tantos e-mails sobre PCRs, uma coincidência da vida nos traz para mesma cidade do outro lado do Atlântico. À Bianca por ter lido e comentado a tese.

A UnB me proporcionou momentos e descobertas incríveis, mas com certeza as pessoas que dali eu levo são as mais especiais. Um agradecimento mais que especial pra quem estive ali comigo desde o comecinho e fez dessa trajetória mais especial, sempre acreditando e me apoiando, Alessa, Ivy e Camila.

Aos meus irmãos de lenço que abriram o mundo do movimento escoteiro para mim e são uma saudade semanal constante. Para cada jovem que passou pela tropa escoteira do GEBS enquanto eu estive nela, vocês foram fundamentais em me manter equilibrada e desconectada das loucuras da vida e aos escotistas e amigos Kiko, Márcio, Celina, Reinaldo, Gabriel e Roberta.

À Laura, que passou de irmã mais nova da minha amiga, para jovem que eu era responsável e hoje é com certeza é uma mistura de amiga, parceira de aventuras e irmã mais nova. À Rosana, por ter me virado de cabeça pra baixo e aberto meus olhos para tantas coisas.

Por me ajudar a me encontrar e por tudo que eu jamais vou conseguir explicar. À Júlia por ter me ensinado muito mais do que eu te ensinei, por ter permitido que eu contribuísse para seu crescimento e conquistas.

Aos integrantes mais especiais da família Guimarães Paula, Bernardo e André. Ao Gabriel, Tia Mônica e tio Gilberto. À Suellen que sempre é tão cuidadosa comigo e me perdoa mesmo eu sumindo. Ao Ícaro, companheiro de todos esses anos e obrigada por me apresentar meu novo vício em Critical Role que ajudou a superar momentos complexos.

As amigas de infância que há 20 anos fazem parte de quem eu sou, Maria Carolina e Vanessexxy. Obrigada por todo carinho e amor nesses anos, por me apoiarem, me escutarem, torcerem por mim e me darem mais créditos de inteligência do que eu realmente tenho.

Ao meu casal que eu irei celebrar o casamento, Remilton e Vanessa. Remilton por ser essa Barbie multifuncional incrível que sempre está disposto a resolver tretas, fofocar comigo e cuidar da Vanessa. Vanessa, por todo abrigo físico e emocional, por me compreender, cuidar de mim e nunca me deixar sentir desamparada.

À minha psicóloga, Mariana, pelo trabalho incrível desde que eu comecei o doutorado, pela paciência e por topar continuar trabalhando comigo mesmo a distância.

A quem eu considero família, de sangue ou não, que me apoiou, torceu e acreditou em mim. Tia Louders, Tio Oswaldo, Cláudio, Lílian, Tia Neuza, Iana, Tia Cida, Taty, Monara, Michely, Valentina, Rodrigo, Tio Ricardo e Vó Altair. Ao meu quase irmão gêmeo Diego, que a vida adulta, as semelhanças sobre como ver a vida e vontade de cuidar um do outro continue a nos aproximar cada vez mais.

À Bibi, um dos maiores presentes que a vida me deu. Não tem pessoa que participe da minha vida que não saiba quem é você e o quão fundamental e importante você é. Obrigada por garantir desde 2012 que eu sempre tenha pra quem correr, por abrir as portas da sua casa (literalmente), da sua vida e ser ponte para que eu conheça tantas outras pessoas incríveis. A minha vida e minhas relações hoje são fundamentalmente pautadas por eu ter te conhecido e eu não gostaria que fosse diferente. À Kel, por todo seu amor traduzido em forma de funcionalidade prática. Obrigada por me inspirar a ser uma mulher mais forte, por sempre me lembrar do que eu mereço e do que eu devo ou não aceitar. Ao Daniel, my darling, por dividir paixões e interesses comigo por aleatoriedades da vida. Por ser alguém que eu possa falar literalmente qualquer coisa sem “shame” alguma e sempre fazer de tudo pra me colocar pra cima. À Gra, por ter sido essa surpresa quentinha e aconchegante como um chá em um dia de inverno na minha vida. E obviamente pelo passe vitalício para suas festas de aniversário. Ao Renan por ser parceiro, por me ouvir e por constantemente me lembrar que o doutorado é apenas

uma fase, com seus altos e baixos, mas apenas uma fase. À Vick, que cuidou de mim de todas as formas possíveis esses últimos meses mesmo com um oceano de distância, eu tenho certeza que essa parceira sobrevive a qualquer coisa agora. Bi, Kel, Vick, Dan, Gra e Renan, coletivamente vocês mantiveram minha sanidade e foram minha maior rede de apoio. Obrigada por passarem por isso comigo, por oferecerem todo suporte, apoio, carinho, amor e cuidado sem cobrar nada de volta. Eu não teria conseguido sem vocês.

A Tia Cida e Vovó Gessi, por cuidarem de mim, acreditarem e torcerem tanto por mim. Obrigada por serem companhia da minha mãe, junto com a Bella, enquanto estou longe. E finalmente, à pessoa que mais contribuiu para que esse momento chegasse, minha mãe, Maria das Dores. Há 27 anos você partilha dos meus sonhos e faz absolutamente tudo para que eu tenha chance de lutar por eles. Não foram 27 anos fáceis, a vida não foi gentil ou justa com você ou conosco por muitas vezes, mas isso nunca te impediu de ter certeza que com as oportunidades corretas eu chegaria até aqui. Lembro que quando eu era criança você cantava pra mim “Amor pra recomeçar” do Frejat e hoje no meio desse turbilhão de emoções e saudades é o que eu tenho ouvido constantemente e lembrando de você. E assim como você deseja pra mim, eu desejo tudo que a letra fala pra você. Muito obrigada por ser base, meu porto seguro e por todas as oportunidades. Se eu cheguei aqui foi graças a você. Amo muito você e a Bella.

Danksagung - Deutschland

I would like to thank the DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) for the fellowship who allowed me to conduct part of my Ph.D thesis at the University of Bonn in Germany.

I would like to thank Prof. Dr. Bernardo Franklin for being my “German” supervisor during my Ph.D time in Germany. It was a pleasure to be accepted in your lab and work and learn from you on this almost two years. Thank you for pushing me forward and for the help in figure out the next steps of my career.

I was lucky enough to catch the attention of another excellent PI and I would like to thank Prof. Dr. Dagmar Wachten. For taking the time to provide guidance and ideas for the project as well as trusting in my work.

My time in the Institute of Innate Immunity in the University of Bonn was amazing mostly due the amazing team of people who works here, from students to post-docs, technicians and all the staff present here.

A special thanks to everybody in the AG Franklin group who gladly accepted to listen and contribute with adipose tissue related problems even if they did not work with it. Damien, Connie, Salie, Ibrahim, Lucas, Matilde and specially Nathalia and Sophie. Thanks for all the ideas, practical help, parties, good food, laughs in the office and amazing work atmosphere. Also, I would like to thank other members from the Institute who practically collaborated with this work, Juan and Tom but are also part of the people in the III that makes daily work life fun, together with: Alesja, Petro, Felix, Fraiser, Christabell, Max, Anette, Pia, Miki, Jen, Leoni, Yubell, Romi, Lena, Anil, Paola, Marta and Jasper.

Going abroad is always a roller coaster of emotions, it can be incredibly excitement and fun, but also with lots of downside, especially in the middle of a Pandemic that completely prevents you for going home. With that in mind, I'll be forever grateful for the people who helped me make a home out of Bonn.

Lucas, you were the very first person that I saw here, and by the middle of our Tusculo first lunch we could already see that "o santo bateu". Thanks for being a friend and a mentor, for the attention that you gave to me scientifically and most importantly personally taking care of me. You're a piece of home here, and bringing Paty to the occasion only made it better. I will take this opportunity to thank you, Paty, for always being welcome to me and patience with my break downs at your place. You guys are family for me here, and I can only be extremely excited and happy for the next years also in the company of the precious Pietro Campi Ribeiro! Marina, I don't remember the exact point that we became friends here but it was for sure one of the greatest gifts that Bonn gave to me. I don't know how I'll make here without my Brazilian partner who understand me before I even finish to say anything. My amazing Mediterranean family, Juan (grumpy eyes), Marta (baby) and Mati (Artemisia), thanks for bringing a more southern flavor and noise to the life in Bonn. Our family dinners with an excessive amount of food, our loud conversations (Juan will miss his chickens so much) in a mixture of Portuguese, Italian and Spanish, and all the love we share together will always be on the top of my favorite memories from this time.

Another special thank you to my lovely german friends, Salie, Lena, Romy and Ibri (you're here as epigenetically german). You guys presented me with the most loving side of the culture here, and always made sure that I would feel welcome and on the right place. Having you by my side makes life more easy, light and fun.

Julia, my other half on this side of the Atlantic. Meeting you here was a one of those things in life that we don't know how much we need until it happens. You know how fundamental your friendship is for me and now you need hang with me for the rest of your life.

Thanks for being a voice of reason that I constantly need, for taking care, for the love and for also let me in on your life as a close friend.

Jasmine, having a no scientist friend here was necessary, this friend being you was me being extremely lucky. It is so amazing finding someone who sees life in a similar way than I do and values the same things. Thank you for the patience, for constantly checking in and taking care that I'm in a good shape. I promise I'll be a better friend now.

Lastly, I would like to thank the University and the city of Bonn, for being my home away from home, a happy one. Vielen Danke!

ÍNDICE

Resumo	16
Abstract.....	18
Lista de Figuras.....	20
Lista de Tabelas	23
Lista de Abreviaturas.....	23
Introdução.....	26
• O Sistema Imunológico.....	26
• Resposta imunológica inata	27
• Os Inflamassomas	30
• Tecidos Adiposos.....	37
• A obesidade.....	44
• Obesidade e as disfunções dos tecidos adiposos	46
• Justificativa	50
CAPÍTULO I.....	51
Objetivos – capítulo I.....	52
Metodologia – capítulo I.....	53
• Animais de experimentação.....	53
• Indução da obesidade	53
• Teste de tolerância à glicose	55
• Histologia.....	56
• Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo.....	56
• Extração de proteínas.....	56
• Dosagem de Citocinas.....	57

• Extração de RNA e síntese de cDNA	57
• PCR quantitativa (qPCR)	58
• Análise Bioquímica do Soro	59
• Análise Estatística.....	59
Resultados – capítulo I	60
Estabelecimento da obesidade a partir de ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos WT e Asc ^{-/-}	60
Efeitos da dieta hiperlipídica na tolerância à glicose em camundongos WT e Asc ^{-/-}	63
Análise da expressão gênica associada ao metabolismo lipídico em BAT e WAT de animais WT e Asc ^{-/-} após dieta hiperlipídica	64
Diferença no aumento da produção de ROS em células da cavidade peritoneal a partir de ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos WT e Asc ^{-/-}	65
Efeitos da dieta hiperlipídica no fígado de camundongos WT e Asc ^{-/-}	66
Discussão/Conclusões – capítulo I	71
CAPÍTULO II.....	74
Objetivos – capítulo II.....	76
Metodologia – capítulo II	77
• Animais utilizados para coleta de tecidos adiposos ou células primárias	77
• Cultivo de macrófagos primários	77
• Cultivo de linhagens imortalizadas	79
• Contagem celular	80
• Geração de meio condicionado	80
• Estímulo de TLRs e ativação dos inflamassomas.....	81
• Dosagem de citocinas.....	82
• Quantificação da liberação LDH.....	84

• Análise de viabilidade celular através de avaliação da capacidade redutor	84
• Analisador Automático de Western Blot - WES™	85
• Ensaio de Atividade de Caspase	85
• Western Blotting.....	86
• Atividade de NF-κB utilizando sistema QUANTI-Blue™.....	87
• Vizualização e quantificação de ASC specks.....	88
• Análise de expressão gênica por PCR quantitativa.....	89
• Análise de Fluxo Extracelular.....	93
• Análise Estatística.....	94
Resultados – capítulo II.....	95
Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT diminui a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos	95
Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT falha em diminuir a ativação dos inflamassomas AIM2 e NLRC4.....	101
O momento de adição do meio condicionado influencia diretamente o efeito gerado em macrófagos ativados.....	103
Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT altera a resposta de macrófagos a ativação de TLR.....	104
Avaliação da expressão gênica de macrófagos cultivados com meio condicionado de BAT e WAT	109
Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT não afeta a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais murinos ou macrófagos humanos.....	116
Caracterização parcial do meio condicionado: efeitos do aumento de temperatura e tratamento com nuclease	119
Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT não afeta o metabolismo energético mitocondrial em macrófagos tratados com LPS.....	121

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT por 24 horas afeta diferencialmente o metabolismo mitocondrial de macrófagos.....	125
Discussão/conclusões – capítulo II.....	135
Conclusões	138
Referências Bibliográficas.....	140
Anexos	153
II – Produções durante o doutorado.....	153

Resumo

O papel dos tecidos adiposos foi estabelecido há muito tempo como um importante órgão endócrino e como mediador de processos em outros órgãos e sistemas, não apenas durante distúrbios metabólicos, mas também na manutenção da homeostase. O tecido adiposo marrom (BAT) e o tecido adiposo branco (WAT) têm características metabólicas diferentes e ambos podem modular a resposta inflamatória. A inflamação pode ser desencadeada pelos inflamassomas, os quais são complexos proteicos que atuam como plataformas de ativação para a protease caspase-1, que leva à um tipo pró-inflamatório de morte celular denominado piroptose e à maturação e liberação das citocinas IL-1b e IL-18, num processo dependente da proteína adaptadora ASC. Já está estabelecida a relevância da regulação do inflamassoma no processo relacionado ao imunometabolismo. Porém, pouco se sabe sobre o papel dos inflamassomas nos mecanismos envolvidos na interação do sistema imunológico com o tecido adiposo e seu impacto nos processos imunometabólicos celulares e no estabelecimento de doenças metabólicas. Neste trabalho avaliamos a função da proteína adaptadora ASC em um modelo in vivo de obesidade induzida por dieta e exploramos os efeitos regulatórios e moduladores que os produtos de secreção dos tecidos adiposos (AT-CM) possuem sobre macrófagos, entendendo o papel que a ativação dos inflamassomas tem neste processo. Inicialmente, observamos que a ausência de ASC promove um maior ganho de peso e esteatose hepática sob dieta hiperlipídica. Curiosamente, no entanto, este fenótipo aparente mais obeso foi acompanhado por uma inflamação menor no fígado. Posteriormente, AT-CM de BAT e WAT provenientes de camundongos C57BL/6J foram utilizados para tratar macrófagos com o inflamassoma pré-ativado ou não. O pré-tratamento com AT-CM de ambos os tecidos adiposos diminui a secreção de IL-1b em macrófagos ativados, embora essa redução seja ainda mais proeminente usando BAT AT-CM. Interessantemente, AT-CM de ambos os tecidos, preveniu a morte celular em macrófagos estimulados com LPS + Nigericina. Além disso, a expressão de NLRP3, a ativação da caspase-1 e a formação de ASC specks são reduzidas nas células incubadas com AT-CM. Este efeito não foi mediado especificamente por TLR4, uma vez que as células estimuladas com TLR2 e os agonistas de TLR8 se assemelham à mesma resposta. AT-CM de BAT e WAT foram capazes de alterar o padrão de expressão gênica global de macrófagos estimulados com LPS, com expressão diferenciada de genes envolvidos com o estabelecimento do perfil anti-inflamatório. Análise de sequenciamento de nova geração apontou ainda para modulação de genes envolvidos com processos metabólicos em macrófagos cultivados apenas com AT-CM. Também na ausência de LPS, o uso de AT-CM WAT por 24

horas induziu macrófagos a adotarem um perfil mais bioenergético que o cultivo com AT-CM BAT. Ao utilizarmos AT-CM proveniente de animais *knockout* para diferentes componentes do inflamassoma, encontramos uma diminuição na taxa de consumo de oxigênio e acidificação extracelular em macrófagos. De forma geral, esse trabalho demonstrou o importante papel que os componentes dos inflamassomas possuem no estabelecimento da obesidade, esteatose hepática e manutenção da homeostase imunometabólica, bem como sobre a comunicação e interação entre tecidos adiposos e macrófagos.

Palavras chaves: inflamassomas, tecido adiposo, obesidade, imunometabolismo, ASC

Abstract

The role of the adipose tissues has been long established as an important endocrine organ and as a mediator of processes in other organs and systems, not only during metabolic disorders but also in a homeostatic, healthy state. Brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) have different metabolic features and both can modulate the inflammatory response. Inflammation can be triggered by inflammasomes, protein complexes that act as activation platforms for the protease caspase-1, leading to a proinflammatory cell death modality called pyroptosis and to maturation of the cytokines IL-1 β and IL-18, in a process dependent on the adaptor protein ASC. It is already established the inflammasome regulation relevance on immunometabolism related process. However, little is known about the role of inflammasomes in the mechanisms involved in the interaction between immune system and the adipose tissue and its impact on cell metabolic processes. In this work, we evaluated the function of the adapter protein ASC in an in vivo diet-induced obesity model and explored the regulatory and modulatory effects that the secretion products of the adipose tissues (AT-CM) display on macrophages, investigating the role of inflammasomes' activation on this process. Initially, we observed that the absence of ASC favored a greater weight gain and liver steatosis under a high-fat diet had. Interestingly, however, this apparent more obese phenotype was accompanied by a smaller inflammation on the liver. Later, BAT and WAT AT-CM derived from C57BL/6J mice were used for treating macrophages which inflammasome was pre-activated or not. Pretreatment with AT-CM from both adipose tissues decreases the IL-1b secretion in activated macrophages, although this reduction is even more prominent using BAT AT-CM. Interestingly, AT-CM from both tissues, prevented cell death in macrophages stimulated with LPS + Nigericin. Furthermore, NLRP3 expression, caspase-1 activation and ASC speck formation are reduced within the AT-CM incubated cells. This effect was not specifically mediated by TLR4, since cells stimulated with TLR2 and TLR8 agonists resemble the same response. BAT and WAT AT-CM were capable of changing the global gene expression patterns in LPS-stimulated macrophages with DEGs involved on the establishment of an anti-inflammatory profile. Next Generation Sequencing analysis also showed modulation of metabolic process related genes on macrophages cultivated only with AT-CM. In the absence of LPS, macrophages cultivated with WAT AT-CM for 24 hours presented a more bioenergetic phenotype compared to WAT AT-CM. Inflammasome knockout derived AT-CM induced a decreased on the OCR and ECAR levels on macrophages. Taken together,

our data indicates a prominent role of inflammasome components during obesity establishment, hepatic steatosis and maintenance of immunometabolic homeostasis, as well as the interplay among adipose tissues and macrophages.

Key words: inflammasomes, adipose tissue, obesity, immunometabolism, ASC

Lista de Figuras

Figura 1- Cascatas de sinalização celular a partir da ativação dos receptores de reconhecimento padrão CLRs, RLRs e CDSs.	28
Figura 2 - Cascatas de sinalização celular a partir da ativação dos receptores de reconhecimento padrão TLRs e NLRs.	29
Figura 3 – Componentes necessários para formação do complexo inflamassoma.	32
Figura 4 - Cascatas de sinalização celular envolvidas nas etapas de montagem e ativação do complexo do inflamassoma a partir da via canônica e da não canônica.	34
Figura 5 – Diferentes funções para ASC specks extracelulares.	36
Figura 6 – Atuação endócrina de adipócitos em diferentes órgãos.	38
Figura 7 Diferentes tipos de adipócitos atualmente caracterizados.	39
Figura 8 – Diferentes populações identificadas no tecido adiposo branco a partir de sequenciamento de célula única.	43
Figura 9 – Distribuição mundial de adultos acima do peso ou obesos.	45
Figura 10 – Etapas para geração de amostras provenientes do modelo de obesidade induzida por dieta.	54
Figura 11 – Delineamento experimental para teste de tolerância a glicose.	55
Figura 12- Análise de ganho de peso de camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	61
Figura 13 - Análise de peso e morfologia de tecidos adiposos em camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	62
Figura 14 - Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	63
Figura 15 - Expressão gênica dos tecidos adiposos marrom e branco.	64
Figura 16 – Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células da cavidade peritoneal em animais submetidos a HFD.	66
Figura 17 - Análise de ganho de peso e morfologia do fígado em camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	67
Figura 18 - Quantificação citocinas encontradas em macerados do fígado de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	68

Figura 19- Expressão gênica no fígado de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	68
Figura 20 – Análise de função hepática, renal e perfil lipídico do plasma do soro de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica.	70
Figura 21 – Etapas de obtenção e processamento de macrófago primários	79
Figura 22 – Processamento para obtenção de sobrenadante de tecido adiposo.	81
Figura 23 – Picos de emissão e excitação de fluoróforos utilizados para microscopia de fluorescência confocal.....	88
Figura 24 – Eletroforese automatizada para controle de qualidade de um dos experimentos independentes que foram submetidos a análise de sequenciamento de nova geração.	92
Figura 25 – Padrão de perfis cinéticos gerados a partir de análise de fluxo extracelular.	94
Figura 26 - Quantificação de IL-1 β (A), IL-1 α (B) e IL-18 por HTRF.....	96
Figura 27 - Liberação de LDH e atividade de caspase-1.....	97
Figura 28 – Oligomerização de ASC e quantificação de specks.....	99
Figura 29 - Avaliação da viabilidade celular.....	100
Figura 30 – Ativação do inflamassoma NLRC4.....	101
Figura 31 – Ativação do inflamassoma AIM2.....	102
Figura 32 – Efeito da adição de meio condicionado em diferentes momentos.....	104
Figura 33 - Quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-10 por HTRF(A e B) ou ELISA (C).	105
Figura 34 - Ação de CM BAT e CM WAT sobre a ativação de TLR 2/1 e TLR7/8.....	106
Figura 35 - Western blot para identificação de proteínas fosforiladas a partir do lisado de BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora.	108
Figura 36 - Modificações no padrão global de expressão gênica de BMDMs cultivados com meio condicionado e estimulados com LPS.....	110
Figura 37 - Modulação da expressão gênica por cultivo com meio condicionado em BMDMs.....	111
Figura 38 - Modulação da expressão gênica por cultivo com meio condicionado em BMDMs estimulados com LPS.....	112
Figura 39 - Análise de ontologia genética – Processos Biológicos..	113
Figura 40 - Análise de ontologia genética “child terms” Processos do sistema Imune. ..	114
Figura 41- Expressão gênica de Il-1 β , Nlrp3, Tnf- α , Nos2, Arg1, Cd206 e Il-10 usando qPCR	115
Figura 42 - Efeito do meio condicionado em macrófagos peritoneais.	117

Figura 43- Efeito do meio condicionado em macrófagos humanos.....	118
Figura 44 - Inativação por calor ou tratamento com endonuclease do meio condicionado.	120
Figura 45 - Cultivo com meio condicionado derivado de animais <i>Asc^{-/-}</i> e <i>Il-18^{-/-}</i>	121
Figura 46 - Taxa de consumo de oxigênio em BMDMs cultivados com meio condicionado.	122
Figura 47- Taxa de acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado.....	123
Figura 48- Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado	124
Figura 49 – Diferenças entre DEGs modulados por cultivo com CM BAT e CM WAT na ausência de LPS.	125
Figura 50 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Asc^{-/-}</i>	126
Figura 51 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Asc^{-/-}</i>	127
Figura 52 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Asc^{-/-}</i>	128
Figura 53 - Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Asc^{-/-}</i>	128
Figura 54 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Aim2^{-/-}</i>	129
Figura 55 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Aim2^{-/-}</i>	130
Figura 56 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Aim2^{-/-}</i>	131
Figura 57- Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Aim2^{-/-}</i>	131
Figura 58 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Casp1-11^{-/-}</i>	132
Figura 59 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Casp 1/11^{-/-}</i>	133
Figura 60 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais <i>Casp 1/11^{-/-}</i>	133

Figura 61 - Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais Casp1-11 ^{-/-}	134
---	-----

Lista de Tabelas

Tabela 1- Ingredientes e quantidades (em g/Kg) para produção de rações controle e hiperlipídica	54
Tabela 2- Sequência de Iniciadores para qPCR	58
Tabela 3- Genótipos dos camundongos utilizados	77
Tabela 4- Sequência de Iniciadores para qPCR	91
Tabela 5 – Compostos utilizados em ensaio de análise de fluxo extracelular	93

Lista de Abreviaturas

AIM2: absent in melanoma 2

ALR: absent in melanoma 2-like receptor

ASC: apoptosis-associated speck-like containing a CARD

ATP: adenosine triphosphate

AT-CM: adipose tissue conditioned medium

AUC: area under the curve

BAT: Brown adipose tissue

BCA: bicinchoninic acid

BMDM: bone marrow-derived macrophage

BSA: bovine serum albumin

CARD: caspase recruitment domain

cDNA: complementary DNA

CLR: C-type lectin receptor

CO₂: carbon dioxide

CTB: CellTiter-Blue®

CLS – *Crown-like structure*

DAMP: damage-associated molecular pattern

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP: deoxynucleotide
PBS: Phosphate Buffered Saline
dsDNA: double-stranded deoxyribonucleic acid
DTT: dithiothreitol
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA: enzyme-linked immune assay
GSDMD: gasdermin D
GTT: Glucose tolerance test
G: drama
HTRF: homogeneous time-resolved fluorescence assay®
HRP: horseradish peroxidase
HFD: High fat diet
IMC – Índice de Massa Corporal
IFN: interferon
IL: interleucina
KO: knock-out
LDH: lactate dehydrogenase
Kg: kilogram
LPS: lipopolissacarídeo
mRNA: messenger RNA
Mg: milligram
NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLR: nucleotide binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor
NLRC: nucleotide binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor, caspase recruitment domain containing protein
NLRP: nucleotide binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor, pyrin domain containing protein
NO: nitric oxide
Oxpl: oxidized phospholipids
PAMP: pathogen-associated molecular pattern
PPAR γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PCR: polymerase chain reaction
PVDF: polyvinylidene difluoride
rhGM-CSF: recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor

RIPA: radioimmunoprecipitation assay buffer
RLR: retinoic acid inducible gene I-like receptor
ROS: reactive oxygen species
RT: room temperature
SFD: Standart fat diet
TLR: Toll-like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor
WAT: White adipose tissue
WGA: wheat germ agglutinin
WT: wild type

Introdução

O Sistema Imunológico

A imunologia como ramo da ciência é considerada por alguns como uma ponte entre a biologia básica e medicina e apesar de ainda ser um campo de estudo altamente dinâmico e de interesses atuais, suas raízes remontam de quando a humanidade passou a tentar entender e manipular como organismos se defendiam adquiriam proteção contra agentes específicos. É possível categorizar o sistema imune de mamíferos em diferentes níveis/camadas de proteção: (I) barreiras físicas e químicas; (II) resposta imune constitutiva; (III) resposta imune inata induzida e (IV) imunidade adaptativa (Paludan; Pradeu; Masters *et al.*, 2021). (I) — Pele, cílios e mucosas atuam como barreiras físicas onde a maior função é permitir uma separação mecânica entre patógenos e hospedeiro. Essas superfícies também possuem agentes característicos que contribuem para eliminação de microrganismos como lisozimas e outros peptídeos antimicrobianos. (II) — Processos permanentemente ativos que podem contribuir para eliminação de microrganismos, mas também possuem outras funções. Geralmente executados não só por células especializadas do sistema imune, mas por uma variedade de tipos celulares. (III) e (IV) — Caracterizadas pela necessidade de um estímulo indutor e reconhecimento através de receptores gerais (III) ou antígeno específicos (IV), são capazes de uma maior amplificação de sinal e maior resposta efetora (Paludan; Pradeu; Masters *et al.*, 2021).

Ainda que a imunidade tenha sido classicamente associada a defesa contra agentes infecciosos, tornou-se claro que o sistema imune também desempenha um papel fundamental em uma variedade de processos fisiológicos não associados diretamente com a relação patógeno-hospedeiro. Além disso, a resposta imunológica também pode ser direcionada a componentes próprios, o que leva a patologias auto inflamatórias (Dinarello, 2009), ou autoimunes (Rosenblum; Remedios; Abbas, 2015). Leucócitos são o agrupamento celular dos quais as respostas inata e adaptativa dependem e são divididas nas linhagens linfóide e mielóide (Murphy; Weaver, 2016). De forma geral, um progenitor linfóide comum dá origem à linhagem linfóide: linfócitos B; linfócitos T; células linfóides inatas (ILC) e células *natural killer* (NK) (Chaplin, 2010). Para a linhagem mielóide, o progenitor comum origina células polimorfonucleares que compreendem: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e mastócitos (Chaplin, 2010). Além disso, o precursor da linhagem mielóide origina, além de leucócitos, eritrócitos e megacariócitos. Células dendríticas, em geral, descendem do progenitor mielóide, mas, em alguns casos também podem ser geradas a partir do progenitor linfóide. A

maior parte das células do sistema imune surgem e iniciam seu processo de maturação na medula óssea, esse podendo ser completado em tecidos. Entretanto, durante o desenvolvimento embrionário também se originam células imunes já residentes em tecidos específicos (Paul, 2013)

A resposta imune celular é iniciada quando agentes indutores são reconhecidos por tipos celulares específicos através receptores. A ativação de receptores inicia uma cascata de ativação que leva células da imunidade inata a produzir mediadores inflamatórios (Janeway; Medzhitov, 2002). Alguns mediadores podem atuar diretamente na destruição de patógenos. Já outros podem promover mudanças no sistema vascular para recrutar várias células imunológicas que irão contribuir para a resposta inflamatória e a eliminação da ameaça, um processo conhecido como inflamação aguda. Células da imunidade inata também podem influenciar no estabelecimento da resposta mais específica, imunidade adaptativa, através de processos diferenciados, como a apresentação de antígenos (Murphy; Weaver, 2016). É fundamental que a resposta aguda seja acompanhada de uma fase de resolução para reestabelecimento da homeostase. Entretanto, uma variedade de razões — por exemplo, ineficiência da remoção do estímulo inflamatório ou falha na inativação/regulação dos agentes efetores — pode levar a inflamação crônica, estado em que o organismo não consegue reestabelecer a homeostase (Furman; Campisi; Verdin *et al.*, 2019).

Resposta imunológica inata

É fundamental que células atuantes na imunidade inata sejam capazes de reconhecer estruturas moleculares pertencentes a microorganismos patogênicos, classificadas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) (Mogensen, 2009). Adicionalmente, estruturas endógenas expostas para em consequência de dano tecidual são reconhecidas por estruturas conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs - *danger-associated molecular patterns*) (Roh; Sohn, 2018). Os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos padrões supracitados, Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs - *pattern recognition receptors*), são codificados em linhagens germinativas e divididos em cinco famílias, com diferenças em seu padrão de expressão, especificidade de reconhecimento e a resposta inflamatória por eles desencadeada (Janeway; Medzhitov, 2002). Se tratando de localização, PRRs podem ser encontrados associados à membrana plasmática ou a compartimentos endossomais, como é o caso dos *Toll-like receptors* (TLRs) e *C-type lectin receptors* (CLRs). De forma complementar,

os receptores citoplasmáticos são: *nucleotide binding domain, leucine-rich repeat (LRR)-containing receptors (NLRs)*, *retinoic acid inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors (RLRs)*, e *absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors (ALRs)* (Brubaker; Bonham; Zanoni *et al.*, 2015). Após a ativação, a maioria dos PRRs induz a formação de complexos macromoleculares intracelulares com proteínas adaptadoras e efetoras que culminam na transcrição ativação de genes pró-inflamatórios que codificam mediadores imunológicos, como citocinas (incluindo interleucinas (ILs) e quimiocinas), e peptídeos antimicrobianos (Newton; Dixit, 2012). CRLs reconhecem açúcares da parede celular de fungos e bactérias, assim como alguns antígenos virais. RLRs reconhecem RNA viral e ALRs detectam dsDNA (*double-stranded deoxyribonucleic acid*). TLRs e NLRs são largamente descritos na literatura e capazes de reconhecer uma grande diversidade de PAMPs e DAMPs de diferentes naturezas (Brubaker; Bonham; Zanoni *et al.*, 2015). As figuras 1 e 2 apresentam em detalhes um apanhado dos principais receptores descritos e seus ligantes, assim como a cascata de ativação desencadeada por cada um deles. De modo a atingir uma melhor compreensão da proposta desse trabalho, aqui entraremos em detalhes apenas da cascata de ativação de TLR4 e posteriormente alguns NLRs.

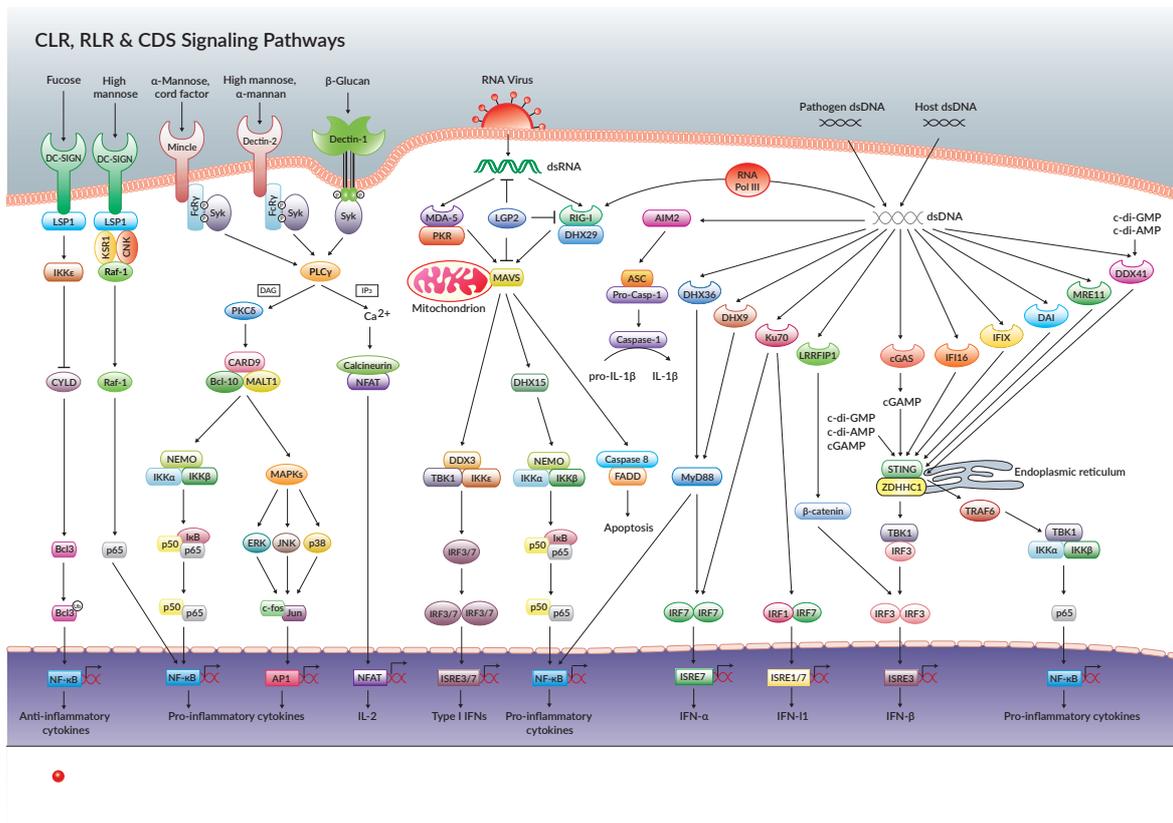


Figura 1- Cascatas de sinalização celular a partir da ativação dos receptores de reconhecimento padrão CLRs, RLRs e CDSs. Fonte: ilustrações encontradas na *webpage* da empresa *InvivoGen*, disponível em: <https://www.invivogen.com/resources/posters-pathways>.

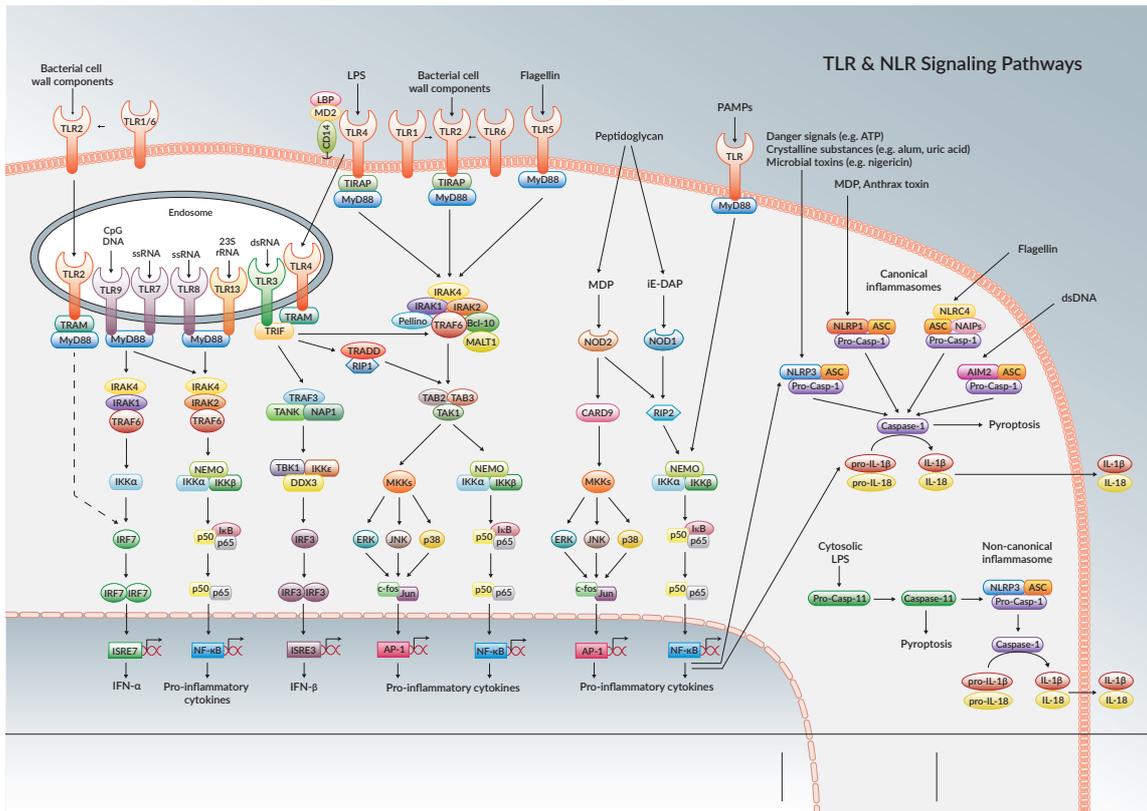


Figura 2 - Cascatas de sinalização celular a partir da ativação dos receptores de reconhecimento padrão TLRs e NLRs. Fonte: ilustrações encontradas na *webpage* da empresa *InvivoGen*, disponível em: <https://www.invivogen.com/resources/posters-pathways>.

Em 1998, cinco receptores homólogos de Toll foram descritos em humanos e nomeados como *Toll-Like receptors* (TLRs) (Rock; Hardiman; Timans *et al.*, 1998). A base molecular da resposta imune inata era até então desconhecida, e entender como ocorria a atuação de interleucinas clássicas, como IL-6, IL-1 e TNF, ainda era um desafio. Antes da descoberta dos TLRs, a imunidade inata era vista apenas como uma resposta rudimentar que serviria de base para o início de uma resposta mais sofisticada, a imunidade adaptativa. Foi com a caracterização dos TLRs, uma década após a primeira proposta de Charles Janeway sobre a existência de PRRs (Janeway, 1989), que essa visão rudimentar sobre a imunidade inata mostrou-se inadequada. Considerando sua habilidade de ativar NF-κB, LPS era um candidato óbvio de PAMP que poderia levar à ativação de TLRs. Levando em conta a vastidão de receptores existentes, poucos foram tão estudados como o receptor ativado em resposta ao LPS. Curiosamente, o receptor de LPS foi inicialmente identificado erroneamente como TLR2 (Yang; Mark; Gray *et al.*, 1998), entretanto, um estudo laureado com o Prêmio Nobel caracterizou de forma certa que o receptor ativado era, na verdade, TLR4 (Black; Croom; Eisen *et al.*, 1998). Molecularmente a sinalização de TLR é iniciada a partir da dimerização dos receptores, induzida pelo ligante.

TLRs possuem um domínio TIR (Toll-IL-1-resistance), que engaja com o domínio TIR de uma das proteínas adaptadoras, ou MYD88 (myeloid-differentiation primary-response) ou MAL (Myd88-adaptor protein like), ou TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), ou TRAM (TRIF-related adaptor molecule). TLR4 pode ser ativado estando presente na membrana plasmática ou na membrana endossomal, e a sinalização em resposta ao LPS é dependente de interação com a proteína MD2. A cascata induzida a partir de ativação do TLR4 pode ser dependente ou independente de MYD88. O passo a passo dos complexos formados é encontrado na figura 2. Duas principais famílias de fatores de transcrição podem ser acionadas a partir de TLR4, NF- κ B e IRFs (Interferon regulatory factors), responsáveis por desencadear vários outros passos importantes da resposta inflamatória (O'Neill; Bowie, 2007). A ativação de NF- κ B iniciada pela sinalização de TLR acaba por convergir na preparação de moléculas que vão ser processadas em resposta a ativação de outra família de PRRs, neste NLRs, como detalhado no próximo tópico.

Os Inflamassomas

Desde sua descoberta em 2002, os inflamassomas foram identificados como mais uma unidade fundamental para o processamento de PAMPs e DAMPs. Foram então definidos como um complexo multiproteico intracelular que é montado a partir da ativação de sensores proteicos, no caso PRRs, levando à ativação proteolítica de caspases pró-inflamatórias (proteína efetora) que irão direcionar os próximos passos da resposta inflamatória (Martinon; Burns; Tschopp, 2002).

Os diversos PRRs citoplasmáticos que possuem a capacidade de atuar como sensores de montagem do inflamassoma são divididos e classificados de acordo com seus domínios proteicos (Figura 3). A família de sensores NLRs agrupa diversas moléculas que atuam nesse papel, como: *pyrin domain containing protein* (NLRP)1; NLRP3; NLRP6; NAIP/NLRC4 (NLR *caspase recruitment domain containing protein*); NLRP7; NLRP9b, NLRP10 e NLRP12 (Ting; Lovering; Alnemri *et al.*, 2008). Dentro dessa família, os domínios já caracterizados e essenciais para a montagem do complexo são: LRR (*leucine-rich-repeat*); NBD (*nucleotide-binding domain*); AD (*acid activation domain*); (*caspase recruitment domain*) CARD; BIR (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat*) e PYD (*pyrin domain*). Apesar de os sensores NLR serem os mais largamente estudados, é importante também destacar a existência dos sensores AIM2 (*absent in melanoma 2*) e Pyrin (*Rho-GTPases*), caracterizados por possuírem os domínios HIN e B30.2/SPRY, respectivamente (Fernandes-Alnemri; Yu; Datta *et al.*, 2009).

Ao nível molecular, a ativação de inflamassomas ocorre através de interações homotípicas entre os domínios de seus componentes chaves, sensores e proteína efetora, podendo haver ou não a necessidade de uma proteína adaptadora (Latz; Xiao; Stutz, 2013). A principal consequência da ativação dos inflamassomas é a ativação proteolítica das citocinas IL-1 β e IL-18, que possuem seus precursores clivados pela caspase-1 ativa (Martinon; Burns; Tschopp, 2002). Caspases são endoproteases dependentes de cisteína que contêm um domínio CARD e duas subunidades catalíticas de 20 e 10 kDA (p20 e p10). Para entrarem em um estado de conformação ativo, é necessário a quebra do *linker* entre as duas subunidades catalíticas por auto proteólise, que ocorre pela aproximação de várias moléculas mediadas pelo domínio CARD (Broz; von Moltke; Jones *et al.*, 2010). Considerando que a integração entre sensores e caspase-1 para montagem do complexo é mediada pela interação entre os domínios CARD, todos os inflamassomas que não o possuem precisam da proteína ASC (*apoptosis-associated speck like protein*) para mediar a interação (Prochnicki; Mangan; Latz, 2016).

A proteína ASC possui dois domínios estruturais, PYD e CARD, conectados por 23 aminoácidos em uma região *linker*. Sensores e ASC se conectam através de interações entre os domínios PYD, e o domínio CARD é responsável pelo recrutamento de caspases, induzindo sua aproximação e auto-clivagem. A interação dos domínios PYD de moléculas de ASC também é possível e leva à oligomerização da maior parte dos monômeros disponíveis dessa proteína no citoplasma, formando uma estrutura conhecida como “*ASC specks*”, ou “*pyroptosomes*”. *ASC specks* são, portanto, locais de recrutamento e ativação da pró-caspase-1 e podem ser ainda exportados através de membranas celulares, disseminando inflamação no espaço extracelular após internalização e liberação pelos endossomos (Franklin; Latz; Schmidt, 2018).

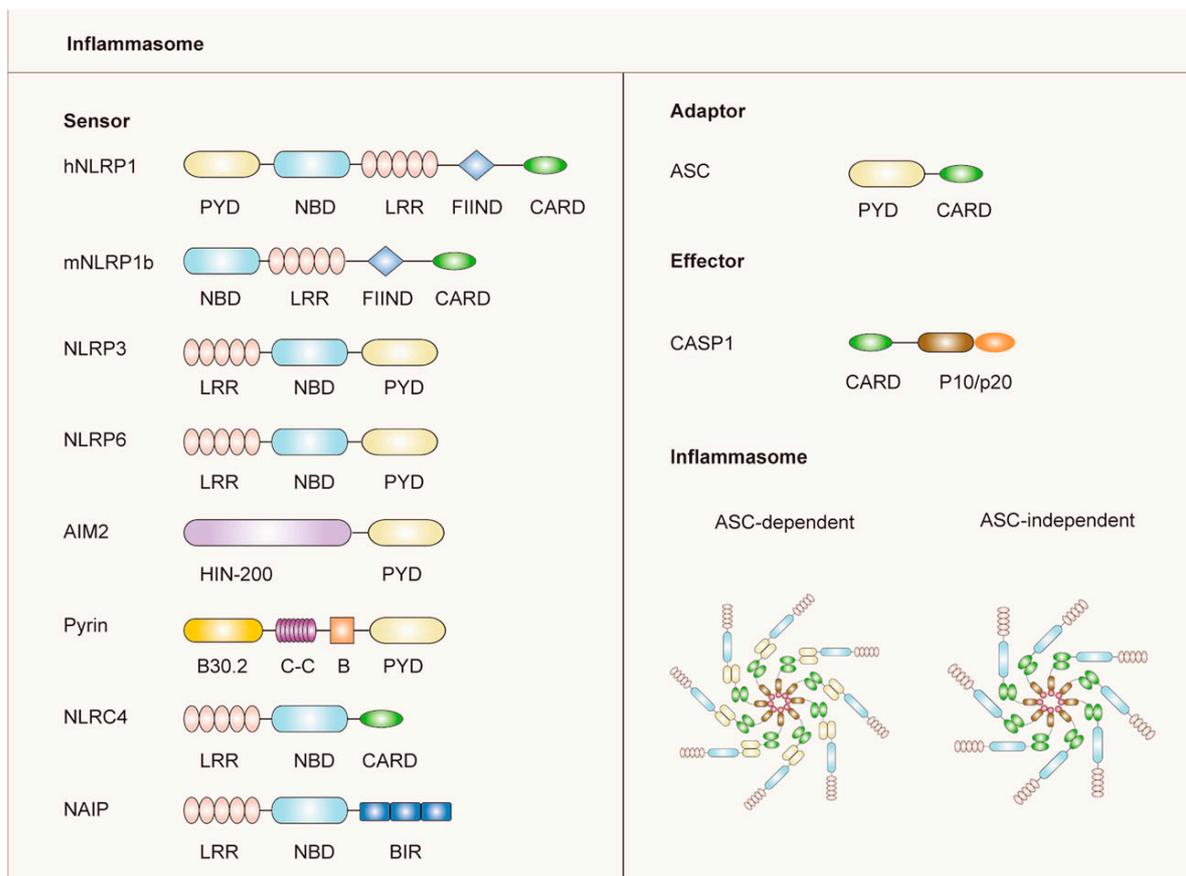


Figura 3 – Componentes necessários para formação do complexo inflamassoma. Fonte: (Xing; Li; Gao *et al.*, 2019).

Assim como ocorre para caspase-1, os precursores inativos de IL-1 β e IL-18 se acumulam no citoplasma (pró IL-1 β e pró IL-18). Após a ativação da caspase-1, as interleucinas são então clivadas em fragmentos de 17 kDa. IL-1 β estimula a secreção de outras citocinas pró inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 α , assim como outros fatores responsáveis pelo recrutamento e diferenciação de outras células imunes. Sistemáticamente, liberação de IL-1 β está associada com indução de febre e outros sinais inflamatórios, como produção de proteínas de fase aguda no fígado. Ambas citocinas, IL-1 β e IL-18, após ligação com seus respectivos receptores, induzem a formação de complexos de alta afinidade (Dinarello, 2018). Através de sinalização pelo domínio TIR (toll-interleukin 1 receptor) esses complexos recrutam a proteína adaptadora MyD88, dando início a uma cascata de eventos que culminam na ativação de fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória. Entretanto, é importante ressaltar que alguns estudos apontam que a liberação constitutiva de IL-18 no intestino tem efeito benéfico na proteção da barreira epitelial desse órgão, conferindo um caráter pleiotrópico a essa citocina (Elinav; Strowig; Kau *et al.*, 2011).

Além da secreção de citocinas, a auto proteólise de caspase-1 leva à clivagem de uma molécula chave na indução de piroptose: proteína citosólica solúvel gasdermina-D (GSMD).

Piroptose é um tipo de morte celular programa lítica que se distingue morfológicamente da apoptose, sendo caracterizada por inchaço celular, ruptura da membrana citoplasmática e consequente liberação de sinais pró inflamatórios para as células vizinhas (Broz; Pelegrin; Shao, 2020).

De modo a garantir o máximo de eficiência, mas, em simultâneo, evitar uma resposta inflamatória exacerbada, que pode levar a disfunções metabólicas e autoimunes, é fundamental que os processos de ativação e inibição dos inflamassomas sejam altamente regulados. Existem quatro modelos atualmente propostos de ativação do inflamassoma NLRP3: ativação canônica (Munoz-Planillo; Kuffa; Martinez-Colon *et al.*, 2013); não canônica (Kayagaki; Warming; Lamkanfi *et al.*, 2011); alternativa (Gaidt; Hornung, 2017) e uma “via metabólica” de ativação através de estímulo direcionado ao metabolismo glicolítico. Para melhor elucidação, a não ser que explicitamente indicado, trataremos sempre a via canônica como base nesse trabalho. Com poucas exceções, a ativação de NLRP3 é classicamente dividida em dois processos (Figura 4). Inicialmente, uma etapa de iniciação (*priming step*) (por exemplo, ativação de TLR4 por LPS) promove a ativação de NFkB, que resulta na transcrição de NLRP3 e pro-IL-1 β , uma vez que esses não estão presentes de forma basal no citosol. Alternativamente, a etapa de iniciação também induz modificações pós-traducionais (PTMs) na molécula NLRP3 que licenciam sua ativação. Entretanto, já existem modelos que provam que superexpressão de NLRP3 dispensa a necessidade do *priming step* (Zheng; Liwinski; Elinav, 2020).

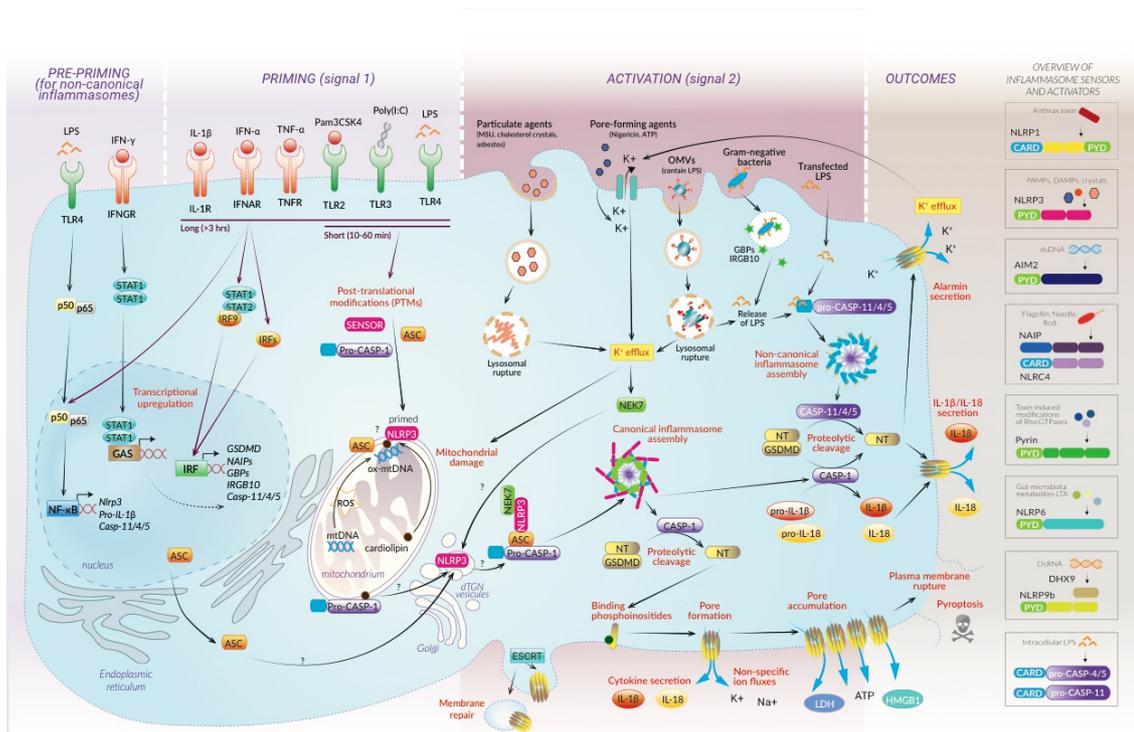


Figura 4 - Cascatas de sinalização celular envolvidas nas etapas de montagem e ativação do complexo do inflamassoma a partir da via canônica e da não canônica. Fonte: ilustrações encontradas na *webpage* da empresa *InVivoGen*, disponível em: <https://www.invivogen.com/resources/posters-pathways>.

Uma vez preparados, os diferentes sensores permanecem em um estado de auto repressão, mas sensíveis à sinalização. Eles são ativados por diferentes PAMPs ou DAMPs, seja através de ligação direta ou eventos intracelulares indiretos. Essa etapa é conhecida como ‘segundo sinal’ ou ‘ativação’. Dentre os principais candidatos capazes de induzir a mudança de NLRP3 para sua conformação ativa e recrutamento de ASC e caspase-1, pode-se citar: ATP (adenosina-trifosfato) extracelular; ionóforos de potássio (K^+), estruturas/partículas cristalinas, além de outros fatores que causam desestabilização lisossomal.

Apesar do mecanismo exato divergir entre os diferentes ativadores, todos os estímulos anteriormente citados atuam diminuindo as concentrações intracelulares de (K^+). Adiante encontram-se exemplos do mecanismo utilizado por dois desses importantes ativadores (Prochnicki; Mangan; Latz, 2016). Em condições basais, a alta concentração intracelular de K^+ é mantida pela atividade da $Na^+/K^+-ATPase$, que importa ativamente os íons K^+ para a célula gerando um gradiente elétrico que favorece o movimento dos cátions para o citoplasma. Concentrações milimolares de ATP aumentam a probabilidade de abertura de P2X7R, um canal catiônico que permite a troca líquida de íons K^+ intracelulares por íons Na^+ ou Ca^{2+} extracelulares (Alves; de Melo Reis; de Souza *et al.*, 2014). Isso produz um efluxo líquido de

K⁺ que atua como um ativador NLRP3. Os ionóforos de K⁺ ativadores de NLRP3 produzem um efluxo líquido de K⁺ através de diferentes mecanismos. A nigericina é um ionóforo carboxílico que pode se ligar a H⁺ ou K⁺ e ambas as formas são permeáveis a membrana plasmática (Perregaux; Barberia; Lanzetti *et al.*, 1992). Dessa forma, a nigericina medeia o transporte de K⁺ do compartimento com maior concentração de K⁺ para o compartimento com menor concentração de K⁺, concomitantemente levando a uma acidificação transitória do citosol. Em estágios posteriores, o aumento citosólico [H⁺] pode estimular os trocadores Na⁺/H⁺ a expulsarem íons H⁺ do citosol, o que é acompanhado por influxo de Na⁺. Em relação aos mecanismos que não dependem do efluxo de K⁺ dentro da via metabólica destacam-se: I - Eventos relacionados a mitocôndria, sendo caracterizados pela inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons ou o DNA mitocondrial. II - Inibição da via glicolítica (Sanman; Qian; Eisele *et al.*, 2016) (Heid; Keyel; Kamga *et al.*, 2013).

Após ativação, as moléculas de NLRP3 se oligomerizam e ligam-se às moléculas ASC que formam fibras longas, decorrentes do oligômero de NLRP3. A proteína adaptadora ASC, possui dois domínios o PYD (ASC^{PYD}) e o CARD (ASC^{CARD}), os oligômeros de ASC produzem filamentos de ASC^{PYD} que são ligados por interações ASC^{CARD}: ASC^{CARD} (Franklin; Latz; Schmidt, 2018). A oligomerização de ASC forma, uma estrutura conhecida como *ASC speck*, ou *pyroptosomes*. *ASC specks* são, portanto, os locais de recrutamento e ativação da pró-Caspase-1 e podem ser exportados através de membranas celulares disseminando inflamação no espaço extracelular após internalização e liberação pelos endossomos (Franklin; Bossaller; De Nardo *et al.*, 2014). Após sua liberação no espaço extracelular essas estruturas podem ter diferentes destinos: amplificar os sinais iniciais de ativação do inflamassoma; intensificar a resposta de células T ampliando a sinalização de IL-1; causar ou intensificar autoimunidade induzindo a produção de anticorpos auto reativos contra ASC; recrutar e ativas Caspases-8 influenciado a resposta apoptótica; e auxiliar na captura de patógenos para futura eliminação por neutrófilos (Figura 5). Se fagocitados, *ASC specks* podem romper o fagossomo se agregar a subunidades de ASC solúveis no citoplasma ou induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 na célula recipiente (Franklin; Bossaller; De Nardo *et al.*, 2014). Estudos independentes já mostraram que camundongos expressando um gene reporter fluorescente para proteína ASC revelaram a presença de *ASC specks* no espaço extracelular e acúmulo em tecidos após a ativação do inflamassoma (Sagoo; Garcia; Breart *et al.*, 2016) (Tzeng; Schattgen; Monks *et al.*, 2016). ASC recruta pró-caspase-1, que é autoclivada em um mecanismo baseado em proximidade. Caspase-1 ativa cliva então pró-IL-1 β e GSDMD. A fração N-terminal da

GSDMD reúne poros na membrana plasmática que facilitam a liberação de IL-1 β madura e culmina em morte celular por piroptose.

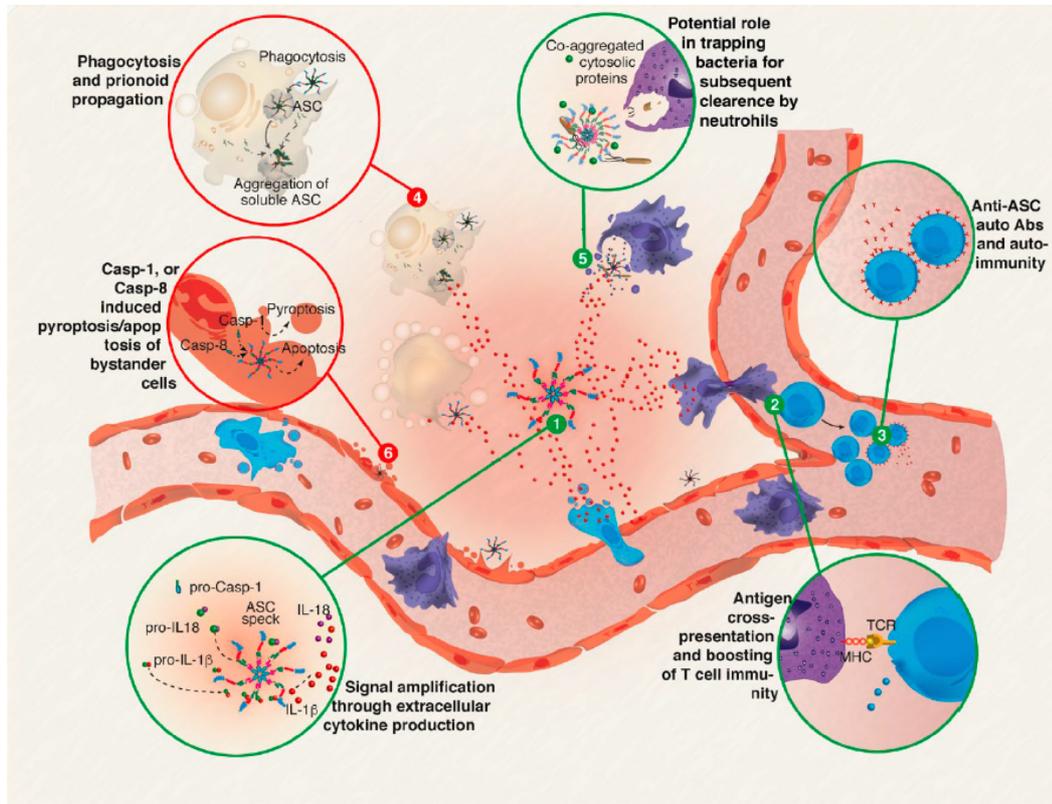


Figura 5 – **Diferentes funções para ASC specks extracelulares.** Fonte: (Franklin; Latz; Schmidt, 2018)

Considerando as outras duas vias de ativação de NLRP3, resumidamente se tem que LPS citosólico é o responsável pela ativação não canônica, cuja presença é detectada por caspases-4 ou -5 humanas, ou por caspase-11 murina. Essas proteases liberam GSDMD e os poros por ela formados são uma rota para o efluxo K⁺, levando ao início da ativação canônica de NLRP3. Já a via alternativa, apesar de também poder ser iniciada pela ligação de LPS ao TLR4, é dependente de caspase-8. que leva a uma cascata de sinalização envolvendo TRIF, RIPK1 (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) e FADD (*Fas-associated protein with death domain*) (Kayagaki; Warming; Lamkanfi *et al.*, 2011) (Kayagaki; Wong; Stowe *et al.*, 2013).

O NLRC4 detecta moléculas bacterianas intracelulares, como a flagelina do aparelho de motilidade, ou proteínas estruturais dos sistemas de secreção tipo III ou IV (T3SS ou T4SS) (Zhao; Yang; Shi *et al.*, 2011). Ao contrário de outros NLRPs, o NLRC4 se associa com outro membro da família NLR, o NAIP, que se liga diretamente aos ligantes bacterianos. A associação de NAIP com os ativadores libera o mesmo da auto-inibição, expondo seu domínio NOD, e esse recruta moléculas de NLRC4. A interação entre os domínios NODs de NAIP e

NLRC4 força também a quebra da auto-inibição de NLRC4. Sequencialmente, NLRC4 passa a recrutar outras moléculas de NLRC4 e inicia-se a montagem da plataforma (Christgen; Place; Kanneganti, 2020). AIM-2 é uma proteína não-NLR que contém um domínio PYD e um domínio de ligação de oligonucleotídeo (Fernandes-Alnemri; Yu; Datta *et al.*, 2009). AIM2 é um receptor para *DNA* citosólico de fita dupla (dsDNA) de origem microbiana ou própria (derivado de dano celular) de forma independente da sequência, mas dependente do comprimento. O *reconhecimento* de dsDNA libera AIM-2 da auto-inibição e induz o recrutamento de ASC através de interação PYD-PYD. Devido às características singulares que cada um dos sensores apresenta, diferentes inflamassomas são regulados por diferentes processos, entretanto, sairia muito do escopo desse trabalho entrar em detalhes de cada um deles. Porém, excelentes apanhados desses mecanismos são brilhantemente abordados em recentes artigos de revisão na literatura (Christgen; Place; Kanneganti, 2020) (Zheng; Liwinski; Elinav, 2020) .

Tecidos Adiposos

Um processo fisiológico fundamental para sobrevivência de organismos multicelulares consiste na capacidade de se estocar energia obtida através da alimentação. Isso é possível graças à atividade de células e órgãos especializados em garantir um armazenamento dinâmico e liberação de energia em ciclos controlados (Wilson; Matschinsky, 2021). Os tecidos adiposos (AT — *adipose tissue*) são os responsáveis por essa tarefa, permitindo um acúmulo de energia em forma de lipídeos, porém sem os efeitos associados à lipotoxicidade que ocorre em outras células. Os primeiros estudos reconhecendo a existência de um tipo celular específico, denominado a época como vesícula de gordura, datam do meio do século XIX (Hassall, 1993) (Lafontan, 2012). Adipócitos, portanto, armazenam triglicerídeos em condições de acúmulo de energia e liberam ácidos graxos para suprir outros tecidos em momentos de jejum ou alta demanda energética. Evidentemente, é necessária uma fina regulação do balanço entre lipogênese e lipólise realizada por adipócitos para se manter uma boa homeostase energética e sensibilidade à insulina no organismo. No início do século XX, as funções associadas com o tecido adiposo eram limitadas ao acúmulo de energia, suporte mecânico de outros tecidos, e em certos casos prevenção de perda de calor (Rose; Shapiro, 1955). Por muito tempo permaneceu-se essa visão, variando-se apenas com os aspectos negativos relacionados ao acúmulo de gordura. A título de comparação, em 1947, uma busca por citações aponta apenas 10 artigos

que se relacionam com tecido adiposo, enquanto em 2019, esse número chega a 139 000 (Richard; White; Elks *et al.*, 2000).

A descoberta da Leptina, primeira citocina derivada de adipócitos, descrita em 1994, foi fundamental para a mudança de paradigma sobre as funções desse tecido que passou a ser considerado um órgão endócrino envolvido na regulação da homeostase energética (Zhang; Proenca; Maffei *et al.*, 1994). A partir dessa descoberta, outras citocinas, hormônios e peptídeos secretados por adipócitos (coletivamente conhecidos como adipocinas) foram identificados e investigados pelo seu papel no controle da homeostase energética (Rondinone, 2006). Um longo caminho foi percorrido no estudo do tecido adiposo, desde os primeiros trabalhos descrevendo a síntese de ácidos graxos em tecido adiposo e seu papel fundamental para o metabolismo lipídico, passando pela descoberta de sua capacidade secreção de adipocinas e microRNAs, envolvimento com o metabolismo de insulina, além da plasticidade associada a esse tecido. Hoje sabe-se que as funções desse tecido vão além de ser apenas um reservatório de gordura, e que seus diversos papéis metabólicos estão intrinsecamente associados com a sua localidade e tipo majoritário de adipócito presente (Figura 6).

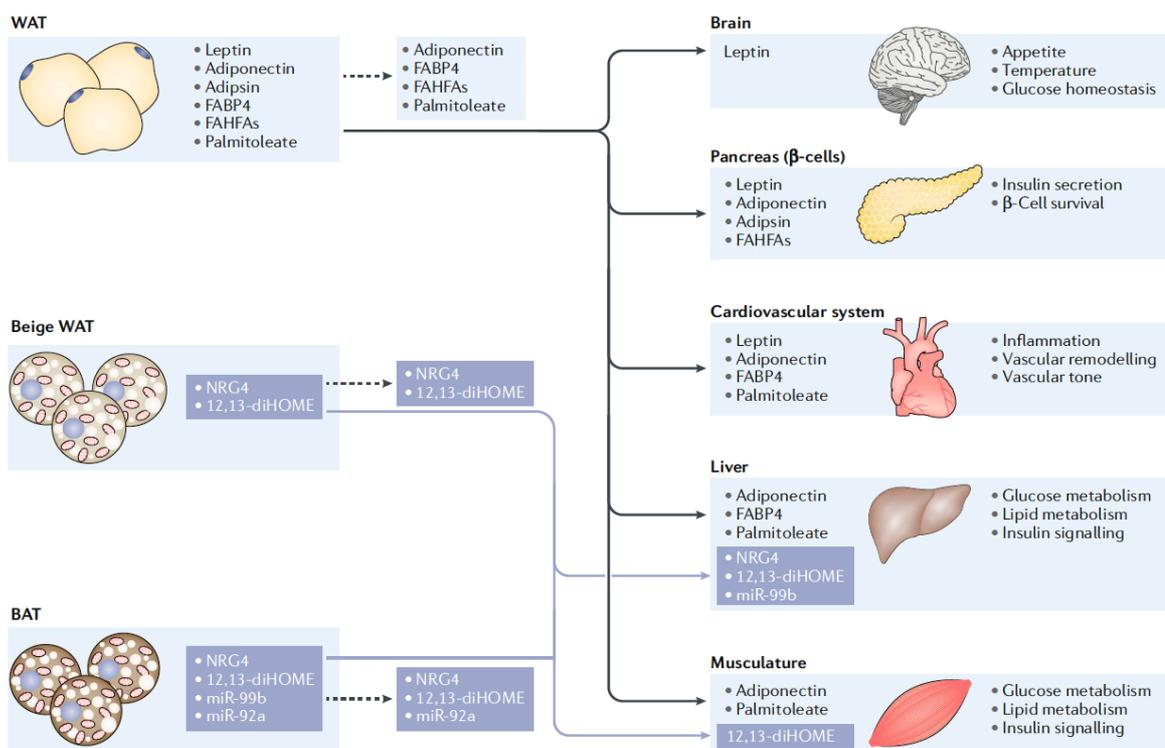


Figura 6 – Atuação endócrina de adipócitos em diferentes órgãos. Fonte: (Scheja; Heeren, 2019)

Os diferentes depósitos de AT no corpo são classicamente divididos com base na composição do principal adipócito que o compõe. Partindo de diferentes progenitores ou processos de transdiferenciação, é possível classificar cinco diferentes categorias de adipócitos (Figura 7): branco; marrom; bege; rosa e amarelo (melhor descritos nas próximas seções). O padrão de secreção de adipocinas é dependente do estado energético e varia conforme o tipo e localização do tecido adiposo, levando à uma variedade de efeitos autócrinos e parácrinos. Dentre os variados processos metabólicos em que adipocinas atuam como importantes mediadores, pode-se citar: oxidação de ácidos graxos; *de-novo* lipogênese; sinalização de insulina; captação de glicose; gliconeogênese e consumo de energia em tecidos metabolicamente ativos, como fígado, musculatura esquelética e cérebro (Ahima; Lazar, 2008).

Leptina, adiponectina, omentina e resistina são exemplos de adipocinas que exercem funções endócrinas, sendo liberadas pelo tecido adiposo e exercendo funções em outros órgãos (Boden; Chen; Mozzoli *et al.*, 1996) (Hu; Liang; Spiegelman, 1996) (Schaffler; Neumeier; Herfarth *et al.*, 2005) (Steppan; Bailey; Bhat *et al.*, 2001). Associada com a regulação do apetite através do sistema nervoso central, níveis circulantes de leptina são positivamente associados com adiposidade. Períodos prolongados de jejum são associados com uma queda nos níveis plasmáticos dessa adipocina, o que leva à indução de apetite. Também associada à sensibilidade e insulina, o hormônio adiponectina tem seus níveis de expressão circulantes inversamente proporcionais à adiposidade, ao contrário do que se encontra para leptina. Omentina e resistina, através de mecanismos distintos, podem ser associadas tanto ao metabolismo glicolítico como ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória no tecido adiposo (Sheng; Di; Jin *et al.*, 2008) (de Souza Batista; Yang; Lee *et al.*, 2007).

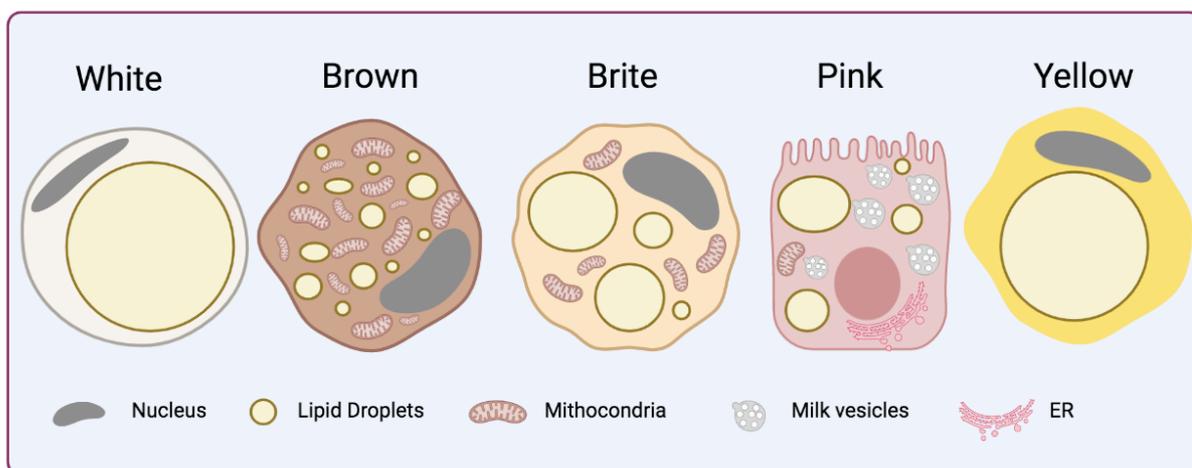


Figura 7 **Diferentes tipos de adipócitos atualmente caracterizados.** Ilustração criada através da plataforma *BioRender* pela autora desse trabalho.

O maior volume de tecido adiposo em mamíferos é constituído pelo tecido adiposo branco. Esse tecido é fundamental para o estoque de energia, sensibilidade à insulina e comunicação endócrina. Adipócitos brancos possuem uma forma esférica e contêm uma única gotícula lipídica que compreende a maior parte do citoplasma, e conseqüentemente outras organelas, como o núcleo, são empurradas para a periferia celular. O tecido adiposo branco pode ser classificado baseado em seus locais de distribuição no organismo: subcutâneo, epicardial, perivascular e visceral (Wronska; Kmiec, 2012).

Tecido adiposo subcutâneo (subcutaneous *adipose tissue* — SAT) é o subtipo de WAT encontrado em maior quantidade no corpo de indivíduos metabolicamente saudáveis e sua distribuição é fortemente influenciada por componentes genéticos (Alligier; Meugnier; Debard *et al.*, 2012; Baker; Gaukrodger; Mayosi *et al.*, 2005). Efeitos benéficos associados ao metabolismo do tecido subcutâneo já foram demonstrados em diferentes trabalhos (Baker; Gaukrodger; Mayosi *et al.*, 2005).

Tecido adiposo epicardial (epiWAT) possui origem embrionária similar à do tecido visceral e está localizado em proximidade com o miocárdio (Ho; Shimada, 1978). Justamente devido a sua localização junto ao coração, epiWAT possui uma atividade metabólica duas vezes mais ativa que outros depósitos de WAT. Altos níveis de captação e liberação de ácidos graxos são associados a esse tecido (Marchington; Mattacks; Pond, 1989).

Tecido adiposo perivascular (PVAT) é localizado em proximidade com vasos sanguíneos, possui características semelhantes com BAT e WAT e é fundamental para homeostase vascular (Szasz; Webb, 2012).

Tecido adiposo visceral é dividido em mesentérico, omental e retroperitoneal - compreende todo o tecido adiposo localizado no compartimento visceral (Kwok; Lam; Xu, 2016). Indivíduos saudáveis não possuem abundância em gordura visceral, quando há um aumento nesses níveis passa a ser considerado gordura ectópica, sendo associada com disfunções metabólicas. Sendo altamente metabólico, esse tecido com frequência libera ácidos graxos no sistema circulatório do tipo porta (Chait; den Hartigh, 2020).

Tecido Adiposo Marrom (Brown adipose tissue — BAT) foi descrito em humanos em 1902 (Cannon; Nedergaard, 2004), mais de quatro séculos depois do primeiro relato da descoberta em roedores (Gessner; Rondelet; Belon *et al.*, 1551). Distingue-se morfológicamente de o tecido branco, primeiro por seu conteúdo lipídico ser separado em diversas gotículas menores espalhadas por toda a célula, bem como pela existência de coloração marrom característica desse tecido, sendo essa atribuída a vasta quantidade de mitocôndrias

presentes nesse tipo de adipócito (Villarroya; Cereijo; Villarroya *et al.*, 2017). A alta incidência dessa organela é essencial para geração de calor e oxidação lipídica no tecido marrom através de processos de termogênese sem calafrios. Isso ocorre graças a altos níveis de expressão da proteína-1 de desacoplamento (UCP1), a qual desacopla a cadeia respiratória, levando à oxidação de substratos metabólicos e dissipação de energia química na forma de calor. Esse processo contribui para liberação de triglicerídeos do plasma e a suavização de depósitos de gordura ectópica. Para além do processo termogênico, o aumento de adipócitos marrons está associado com um perfil anti-inflamatório e capaz de reduzir a resistência à insulina (Fedorenko; Lishko; Kirichok, 2012). Apesar de ser inicialmente relacionado apenas a pequenos mamíferos, animais em hibernação, e no caso de humanos apenas em recém-nascidos, hoje sabe-se que é possível encontrar depósitos de BAT funcional em adultos, como a região interescapular e pescoço (Deshmukh; Peijs; Beaudry *et al.*, 2019).

Tecido adiposo bege foi caracterizado pela primeira vez em 1984 apresentando características tanto de adipócitos marrons quanto brancos, e são geralmente encontrados em depósitos subcutâneos do tecido branco (Young; Arch; Ashwell, 1984). Apesar de existir um debate sobre a origem desse tipo celular, precursores distintos comprometidos com o desenvolvimento em adipócitos beges já foram identificados (Shao; Wang; Song *et al.*, 2019). Acreditava-se também que eles poderiam surgir a partir de transdiferenciação de adipócitos brancos, em último processo conhecido como amarronzamento (*browning*), entretanto a identificação dos progenitores evidencia contradições dessa teoria. Sugere-se, portanto, que o desenvolvimento de adipócitos beges seja atribuído a *de novo* adipogênese de precursores específicos a partir de estímulos iniciais como exposição ao frio, por exemplo (Wu; Boström; Sparks *et al.*, 2012). Entretanto essas células permaneceriam em um estado dormente até que fossem outra vez estimuladas, sugerindo que essas possuem a capacidade de se tornarem rapidamente ativas quando necessário. Além do frio, outros estímulos, como alterações na microbiota, dieta e atividade física já foram identificados como associados aos processos de *browning* (Moreno-Navarrete; Fernandez-Real, 2019). Tendo em vista sua atividade termogênica, adipócitos beges compartilham similaridades clássicas com adipócitos marrons e também expressam uma quantidade significativa de UCP-1, todavia apresentam um padrão único de expressão gênica que os classificam como fisiologicamente diferentes. Morfológicamente também apresentam gotas lipídicas multiculares e uma maior quantidade de mitocôndrias.

Outra evidência que aponta para a alta plasticidade do tecido adiposo é a identificação de adipócitos rosas em camundongos, descrito pela primeira vez em 2014 (Giordano; Smorlesi;

Frontini *et al.*, 2014). Durante a alvéolo gênese da gravidez, em depósitos subcutâneos mamários foi indicado o aparecimento de células epiteliais lipídicas. Evidências indicam que essas células surgem a partir de transdiferenciação de adipócitos brancos, tendo sido também caracterizado um processo de transdiferenciação de adipócitos rosas para adipócitos marrons ao final do processo de lactação. Adipócitos rosas apresentam gotículas lipídicas compartimentalizadas, projeções citoplasmáticas e certa abundância de peroxissomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, mostrando uma estrutura mais típica de células epiteliais (Cinti, 2018).

O tecido adiposo da medula óssea (BMAT) tem ganhado destaque em estudos ao longo da última década, apesar dos primeiros estudos de caracterização desses adipócitos datarem de 50 anos atrás. Em um processo fisiológico conservado entre os mamíferos, a medula óssea hematopoiética vermelha é substituída por medula rica em adipócitos amarela (Scheller; Rosen, 2014). BMAT é uma parte ativa do nicho da medula óssea que exerce funções parácrinas e endócrinas, controlando assim a osteogênese e a hematopoiese. As funções potenciais do BMAT incluem a produção de adipocinas, incluindo várias citocinas (pró-inflamatórias) e efeitos parácrinos por contato direto com células adjacentes que sustentam um ambiente pró-adipogênico de reabsorção óssea. A formação excessiva de BMAT está, portanto, intimamente associada ao desenvolvimento de osteoporose. BMAT existe em duas formas: constitutivo e regulamentado. Essa classificação é feita com base no ambiente ao redor dos adipócitos, bem como na resposta a estímulos externos. Os dois formatos apresentam distintos padrões de evolução, morfologia, saturação lipídica e expressão de fatores de transcrição (Scheller; Cawthorn; Burr *et al.*, 2016).

Para além dos adipócitos, também estão presentes no tecido adiposo: células endoteliais, fibroblastos, eritrócitos, células-tronco mesenquimais, e uma variedade de células imunes (Figura 8). Coletivamente esse conjunto de células é denominado fração estroma-vascular (*SVF- stromal vascular fraction*). Em meados da década de 1960, experimentos que visavam compreender melhor as propriedades metabólicas de adipócitos acabaram por ser pioneiros na identificação de SVFs, após tentativas de digerir o tecido adiposo com colagenase (Rodbell, 1964). Ao longo dos anos seguintes, vários estudos avançaram nesse campo, a respeito de melhores formas de isolamentos dessa fração e de sua caracterização, mas ainda de forma muito fragmentada. Ao início da década de 1990 sabia-se que em estados de disfunções metabólicas o AT aumentava a produção de TNF- alpha (Hotamisligil; Shargill; Spiegelman, 1993), entretanto apenas 10 anos depois foi esclarecido que macrófagos do tecido adiposo (*ATM – adipose tissue macrophages*) eram os responsáveis por esse fenômeno (Weisberg; McCann;

Desai *et al.*, 2003). Atualmente, o estabelecimento da técnica de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq - *single cell sequencing*) permitiu o avanço do conhecimento sobre a complexidade celular e plasticidade de vários tecidos, incluindo o tecido adiposo (Sun; Modica; Dong *et al.*, 2021) (Rondini; Granneman, 2020) (Deutsch; Feng; Pessin *et al.*, 2020).

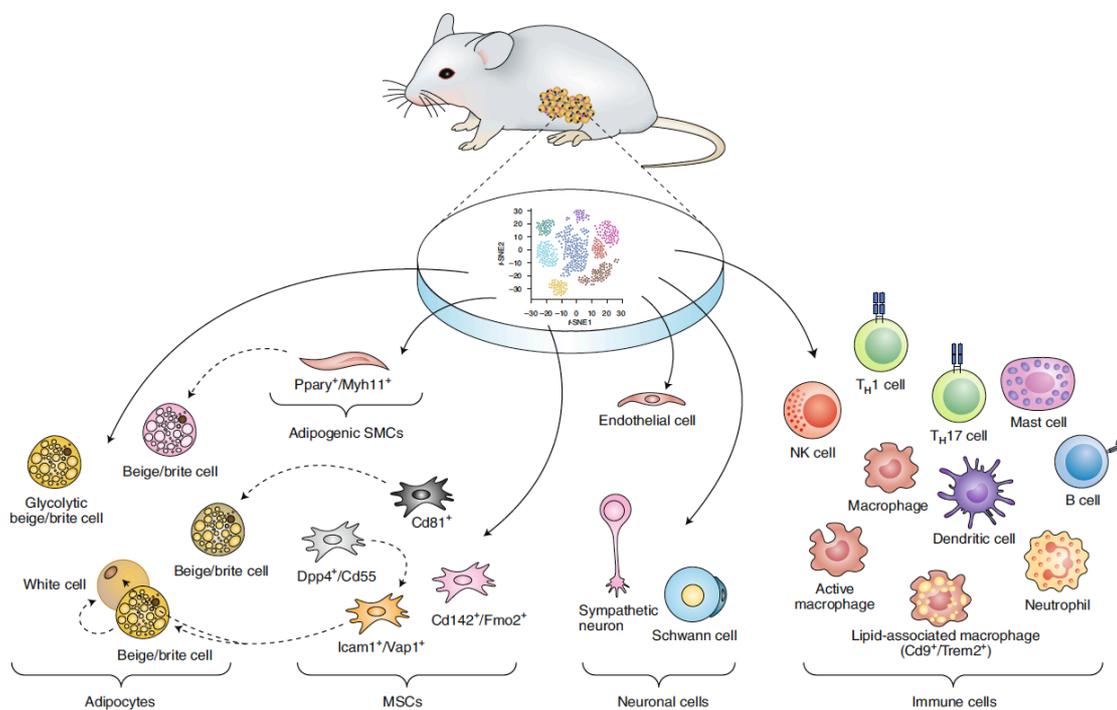


Figura 8 – **Diferentes populações identificadas no tecido adiposo branco a partir de sequenciamento de célula única.** Fonte:(Sun; Modica; Dong *et al.*, 2021).

Considerando que apenas entre 10% e 30% do tecido adiposo consiste em adipócitos maduros, fica evidente o papel crucial que as células do estroma possuem no que tange a diversidade de funcionalidade desse tecido. Essa população é essencial para manutenção da homeostase, como em processos patofisiológicos, podem se comunicar com os adipócitos tanto através da secreção de fatores como pela captação de lipídeos. A composição e quantidade dos diferentes tipos celulares que compreendem essa fração é altamente dinâmica e pode ser influenciada pelo estado nutricional e estímulos ambientais sofridos pelo tecido.

Assim como para maioria dos outros órgãos, muito da caracterização do tecido adiposo se deve ao estudo em animais, especialmente camundongos, gerando o conhecido debate do

quão válido é usar o modelo murino para inferir conhecimentos acerca do que ocorre em humanos. Abordagens de análises de célula única (*single cell*) permitem a comparação das populações celulares do tecido entre as duas espécies. A maioria das populações clássicas do tecido — células imunes, endoteliais, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos maduros — têm sua presença conservada, variando apenas as proporções em que se encontram nas duas espécies.

Para adipócitos maduros, é observada a mesma assinatura de expressão gênica de marcadores clássicos, como adiponectina e leptina, tanto em camundongos como em humanos. Entretanto, marcadores específicos de algumas subpopulações são apenas parcialmente conservados. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que o funcionamento do tecido adiposo é altamente dinâmico e regulado por fatores ambientais e nutricionais. Além disso, humanos apresentam um maior *background* de variabilidade genética do que camundongos de experimentação, essas variações também já foram diretamente associadas como influenciadoras do metabolismo de tecido adiposo (Sun; Modica; Dong *et al.*, 2021). Outro fator importante a ser considerado ao tentar associar resultados encontrados em modelos murinos e humanos é a diferença anatômica na distribuição dos depósitos de tecido adiposo nas duas espécies (Zhang; Hao; Shao *et al.*, 2018) (Chusyd; Wang; Huffman *et al.*, 2016).

A obesidade

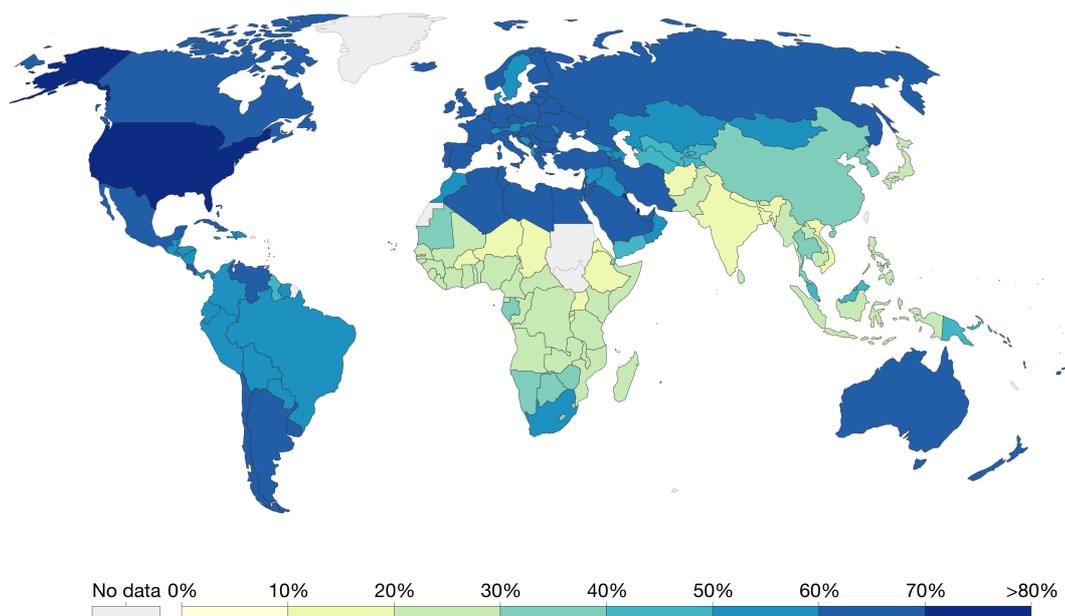
Obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como acúmulo de gordura anormal ou excessiva apresentando perigo a saúde. Uma das principais formas para diferenciar o *status* de um indivíduo em relação a peso ideal, sobrepeso e obeso é a utilização do cálculo de Índice de Massa Corporal (IMC). O IMC é calculado a partir de dados de peso, altura e sexo do indivíduo. A OMS classifica indivíduos como: abaixo do peso (IMC < 18,5); com peso ideal (IMC > 18,5 e < 25); com sobrepeso (IMC > 25 e < 30) e obeso (IMC > 30).

A epidemia da obesidade apresenta um aumento de mais de 100% em quase todo o mundo desde 1980. Dados da OMS revelam que em 2016 39% da população mundial de adultos estava acima do peso e 13% estava obesa (figura 9). Em 2019 estima-se que 38.2 milhões de crianças menores que cinco anos tinham sobrepeso ou obesidade. Para crianças e adolescentes entre as idades de 5 e 19 anos, dados de 2016 apontam para mais de 340 milhões acima do peso ou obesas. A projeção para 2025 é que o número de adultos com sobrepeso seja de 2,3 bilhões; de adultos obesos seja mais de 700 milhões; e o número de crianças acima do peso (sobrepeso

e obesidade) poderá chegar a 75 milhões (WHO, 2014). Segundo 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%).

Share of adults that are overweight or obese, 2016

Being overweight is defined as having a body-mass index (BMI) greater than or equal to 25. Obesity is defined by a BMI greater than or equal to 30. BMI is a person's weight in kilograms divided by his or her height in metres squared.



Source: WHO, Global Health Observatory

OurWorldInData.org/obesity • CC BY

Figura 9 – Distribuição mundial de adultos acima do peso ou obesos.

Uma preocupação da comunidade médica é o risco elevado de doenças associadas ao sobrepeso e à obesidade, tais como diabetes, doenças cardiovasculares (DCV), hiperlipidemia, e alguns cânceres. No estudo National Health and Nutrition Examination Study 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 (Park; Zhu; Palaniappan *et al.*, 2003). Há também evidências consistentes de que quantidades maiores de gordura corporal estão associadas a riscos aumentados de várias categorias de câncer. Essa desordem metabólica é resultante de um desbalanço entre absorção de energia, gasto energético e acúmulo de gordura.

Diariamente, pessoas com sobrepeso ou obesidade, além dos riscos e consequências evidentes derivados da disfunção metabólica, sofrem também com uma forma resiliente e difusa de estigma social. Controversamente taxados como preguiçosos, gulosos e sem força de

vontade, indivíduos acima do peso sofrem diariamente com o que, recentemente, foi denominado estigma do peso. Sendo vítimas de discriminação em seu convívio familiar, ambiente de trabalho ou educacional, dentro do sistema de saúde e na sociedade de forma geral, o estigma do peso traz consequências psicológicas e físicas graves. Apesar da falta de estudos que avaliem atitudes relacionadas a esse comportamento em escala global, alguns estudos multinacionais apontam para padrões similares de atitudes agressivas nos países participantes (Puhl; Latner; O'Brien *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da obesidade é complexo e multifatorial, o que implica que soluções ultra simplificadas e abordagens que focam em fatores isolados não levam indivíduos a resoluções saudáveis desse problema. Do contrário, esse padrão geralmente leva ao estabelecimento de expectativas não realistas que mascaram as dificuldades enfrentadas por pessoas acima do peso que buscam a mudança de comportamento. Ainda é importante frisar que esse tipo de abordagem frequentemente negligencia a influência dos fatores socioeconômicos, biológicos e ambientais, focando apenas em abordagens individuais.

A OMS, assim como a comunidade científica, reconhece o problema, e mais recentemente tem colocado em prática tentativas mais substanciais de combate ao estigma de peso. É preciso que se fundamente uma nova narrativa pública a respeito da obesidade, que seja coerente com os novos conhecimentos científicos a respeito do assunto, sejam eles de caráter biológico ou social. Um importante consenso foi publicado em 2020 pela revista *Nature Medicine: Joint international consensus statement for ending stigma of obesity*. A publicação é um esforço conjunto de diversos cientistas e associações de prestígio que apontam causas e problemas do estigma do peso, juntamente com recomendações para sua eliminação (Rubino; Puhl; Cummings *et al.*, 2020). É fundamental reforçar que mudanças de comportamentos que estão associados a conceitos que, apesar de errôneos, estão fortemente enraizados na sociedade, só são possíveis com fortes iniciativas educacionais e de políticas públicas.

Obesidade e as disfunções dos tecidos adiposos

Disfunções no tecido adiposo podem levar tanto ao acúmulo não saudável de gordura (obesidade) como à sua perda excessiva (lipodistrofia). As síndromes de lipodistrofia abrangem doenças diversas, caracterizadas pela ausência seletiva de tecido adiposo. As principais consequências são a perda de adipócitos funcionais, levando à esteatose ectópica, dislipidemia grave e resistência à insulina. Alterações no processamento de microRNA por adipócitos

brancos e marrons associam-se aos mecanismos moleculares de desenvolvimento da lipodistrofia. Maiores implicações dos mecanismos e consequências da lipodistrofia podem ser encontrados em excelentes revisões da literatura, entretanto o tema foge ao escopo do presente trabalho, portanto maiores detalhes não serão abordados aqui (Fiorenza; Chou; Mantzoros, 2011) (Nolis, 2014).

O acúmulo anormal de gordura também apresenta riscos graves a homeostase. Juntamente com o acúmulo de gordura em órgãos reguladores como fígado, pâncreas e músculo esquelético, o aumento desproporcional de tecido adiposo visceral também é considerado acúmulo de gordura ectópica, trazendo todos os riscos da lipotoxicidade. Parte dos mecanismos e consequências desses problemas serão melhor descritos nas próximas seções.

A expansão do tecido adiposo durante a obesidade pode ocorrer de duas maneiras: hipertrofia ou hiperplasia, ou ambos (Choe; Huh; Hwang *et al.*, 2016). A primeira corresponde a um aumento dos adipócitos existentes e a segunda trata do aumento do número de adipócitos, sendo as duas reguladas por fatores ambientais ou genéricos (Spiegelman; Flier, 2001). A expansão do tecido alcançada por hipertrofia é diretamente associada à disfunção em adipócitos que apresentam anomalias associadas à necrose e resistência à insulina (Kim; Huh; Sohn *et al.*, 2015). Adipócitos hipertróficos também induzem o aumento da expressão e liberação de fatores pró-inflamatórios (Giordano; Murano; Mondini *et al.*, 2013). É importante destacar que o aumento da inflamação causado durante a obesidade diverge do processo inflamatório que ocorre durante uma infecção.

Sendo atualmente conhecido como meta-inflamação, o processo durante a obesidade é estéril, de baixo grau, porém crônico e afeta o controle metabólico do fluxo de nutrientes para tecido adiposo e também fígado pâncreas e músculos. Um dos mecanismos por trás desse descontrole é justamente a geração de resistência à insulina. No tecido adiposo, focos inflamatórios caracterizados por estruturas em forma de coroa (*crown-like structures* - CLS) consistem em adipócitos mortos cercados por macrófagos (Murano; Barbatelli; Parisani *et al.*, 2008) inicialmente foram identificados na gordura visceral e subcutânea, e mais recentemente foram observados em tecido adiposo branco da mama de mulheres e ratas com obesidade (Morris; Hudis; Giri *et al.*, 2011; Subbaramaiah; Howe; Bhardwaj *et al.*, 2011). 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 (Shapiro; Pecht; Shaco-Levy *et al.*, 2013). Como consequência, há a indução da ativação dos macrófagos, via TLR4, estimulando assim a sinalização de NF-κB.

Este, por sua vez, ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo ciclo-oxigenase-2 (COX2), IL-6, IL-1 β , e fator de necrose tumoral α (TNF α) (Shi; Kokoeva; Inouye *et al.*, 2006).

A diminuição da vascularização do tecido adiposo em estado de hipertrofia também é outra característica marcante desse fenótipo, o que acaba por induzir hipóxia local (Trayhurn, 2013). O fator de transcrição HIF1- α (hypoxia-induced factor) é primordial na mediação desse processo, contribuindo para aumento da fibrose do tecido e da inflamação local (Halberg; Khan; Trujillo *et al.*, 2009). Adicionalmente, adipócitos hipertróficos tendem a aumentar a lipólise basal, aumentando o vazamento de ácidos graxos livres (Rutkowski; Stern; Scherer, 2015). Esse excedente de ácidos graxos liberado pelo tecido adiposo é captado por outros órgãos como fígado e músculo, causando acumulação de gordura ectópica e lipotoxicidade.

Para que ocorra expansão por hiperplasia, é necessário que células precursoras se diferenciem em adipócitos maduros, um processo altamente regulado por hormônios e fatores de transcrição (Vishvanath; MacPherson; Hepler *et al.*, 2016) (Jo; Gavrilova; Pack *et al.*, 2009). Ainda há muitas questões a serem respondidas sobre o desenvolvimento da adipogênese, sendo ainda complexo delimitar o momento exato que precursores se comprometem com a diferenciação em adipócitos (Church; Berry; Rodeheffer, 2014). Entretanto, já se sabe que, ao contrário da expansão por hipertrofia, o processo de hiperplasia se associa a fenômenos mais benéficos, como aumento dos níveis de adiponectina e diminuição de fatores inflamatórios e hipóxia.

Observando-se as diferentes formas e taxas de expansão nos variados depósitos de tecido adiposo branco, bem como as interações que levam ou não ao estabelecimento da inflamação e acúmulo de gordura em outros órgãos, estabeleceu-se que existem dois cenários para o estabelecimento da obesidade: metabolicamente saudável ou não. Obesidade não metabolicamente saudável (*MUHO – Metabolically unhealthy obesity*), se apresenta por mecanismos já discutidos anteriormente, onde a taxa de hipertrofia de adipócitos expande a ponto de permitir o acúmulo de gordura em outros órgãos, promover resistência à insulina e evolução da inflamação (Yki-Järvinen, 2014) (Ruderman; Schneider; Berchtold, 1981) (Indulekha; Surendar; Anjana *et al.*, 2015) (Ahl; Guenther; Zhao *et al.*, 2015).

Por outro lado, diversos estudos de coorte reportam que nem sempre indivíduos que apresentam valores de peso que poderiam classifica-los como obesos, trazem uma associação direta com os sintomas de síndrome metabólica. Nomeada de obesidade metabolicamente saudável (*MHO – Metabolically healthy obesity*), essa condição agrupa aqueles que apesar de obesos apresentam taxas normais de glicose, resistência à insulina e baixos marcadores inflamatórios (Sims, 2001) (Primeau; Coderre; Karelis *et al.*, 2011). Enquanto que para MUHO

o acúmulo de gordura é primordialmente visceral, para MHO existe uma tendência de acúmulo em depósitos subcutâneos. MHO apresenta menores riscos de desenvolvimento de DM2 e doenças cardiovasculares e muitas vezes indivíduos são classificados nesse estado se apresentam apenas duas ou menos características de síndrome metabólica (Blüher, 2010). Entretanto, não existe um consenso sobre a definição precisa de MHO, sendo também importante manter-se atento para a possibilidade de progressão para síndrome metabólica com o tempo (Kouvari; Panagiotakos; Yannakoulia *et al.*, 2019) (Mongraw-Chaffin; Foster; Anderson *et al.*, 2018).

Justificativa

A metainflamação – inflamação metabólica crônica de baixo grau – é fundamental para a evolução da patogênese da obesidade e complicações relacionadas. Os mecanismos pelos quais o excedente calórico se associa com fatores genéticos para o estabelecimento e manutenção da inflamação em tecidos metabólicos ainda não são compreendidos em sua totalidade. Identificar alvos e sensores moleculares que participam nesse processo assim como suas funcionalidades é relevante para o estabelecimento de bases teóricas para práticas terapêuticas.

Os inflamassomas e suas vias de ativação são constantemente apontados como alvos de interesse para manipulações ou atuações farmacológicas na busca de redução das consequências de síndromes metabólicas. Entretanto a literatura ainda apresenta um espectro amplo, e por muitas vezes contraditório, de possíveis papéis que componentes clássicos como NLRP3 e caspases 1 podem desempenhar. Ao mesmo tempo que muito pouco se discute sobre o papel desempenhado pela proteína adaptadora ASC, que é indispensável para montagem e ativação da maioria dos inflamassomas.

Para além das consequências associadas com desordens metabólicas, a comunicação entre o tecido adiposo com o sistema imune também se associa diretamente com processos de manutenção da homeostase. Essa relação, que também é diretamente influenciada por diferentes componentes do inflamassoma, atua desde a regulação da resposta inflamatória como processos metabólicos associados ao perfil bioenergético celular.

O presente trabalho aborda os dois aspectos da interface entre tecido adiposo e sistema imune. Com uma divisão em dois capítulos, o primeiro busca entender como a proteína ASC influencia o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta rica em lipídeos em camundongos. O segundo investiga a capacidade de ativação e modulação da resposta inflamatória bem como do metabolismo mitocondrial de macrófagos pelos tecidos adiposos.

CAPÍTULO I

O estado de inflamação crônica característico da obesidade tem sua origem a partir da conexão já pré-estabelecida entre o sistema imune e o tecido adiposo. Entretanto, ainda é um desafio determinar precisamente os sensores moleculares e mecanismos pelos quais esses respondem a mudanças no microambiente, como alterações nutricionais e estado metabólico, que desencadeiam a resposta inflamatória. Paras K. Anand descreve diferentes formas que a regulação do metabolismo lipídico pode ser diretamente correlacionada com a ativação dos inflamassoma — metabolismo do colesterol papel dos ácidos graxos; papel de ácidos graxos, fosfolípidios, esteróis assim como o uso de lipídeos como mensageiros secundários (Anand, 2020).

A análise de diferentes estudos que buscam elucidar o papel do inflamassoma NLRP3 durante disfunções metabólicas apontam que a ausência ou inibição do sensor pode ser associada a um prognóstico benéfico (Rheinheimer; de Souza; Cardoso *et al.*, 2017). Entretanto, a ausência de AIM2 em camundongos também está associada a fenótipos negativos da síndrome metabólica (Gong; Zhang; Su *et al.*, 2019).

A função da Caspase-1 dentro da obesidade é ainda bastante controversa (Wang; Capell; Yoon *et al.*, 2014). Alguns trabalhos mostram que a ausência dessa proteína pode intensificar o ganho de peso e desregulação metabólica (Kimura; Karasawa; Usui *et al.*, 2016) (Wang; Capell; Yoon *et al.*, 2014). Entretanto, em outros estudos temos que a ausência de Caspase-1 acaba por ajudar a prevenir o estabelecimento da obesidade (Stienstra; Joosten; Koenen *et al.*, 2010). A expressão de Caspase-1 diretamente nos adipócitos também é influenciada pela obesidade, tendo sido relacionada à diferenciação dos adipócitos e à resistência à insulina (Stienstra; Joosten; Koenen *et al.*, 2010). Ela é positivamente regulada durante a diferenciação destas células e direcionam os adipócitos a um fenótipo mais resistente à insulina, sua atividade, bem como da IL-1 β , também pode ser 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 (Stienstra; Joosten; Koenen *et al.*, 2010). A expressão de lipase lipoproteica, proteína também associada como marcador de obesidade, foi alterada no BAT de animais deficientes em Caspase-1 (Kotas; Jurczak; Annicelli *et al.*, 2013).

Controvérsias também são encontradas em relação a atuação da IL-18 na progressão da obesidade. Pesquisadores sugerem que IL-18 pode atuar conjuntamente com TNF-alpha no desenvolvimento da resistência à insulina (Krogh-Madsen; Plomgaard; Moller *et al.*, 2006). Entretanto trabalhos recentes apontam que camundongos deficientes em IL-18 tornam-se obesos espontaneamente devido ao acúmulo de lipídeos (Murphy; Kraakman; Kammoun *et al.*, 2016). Considerando que além dos órgãos classicamente afetados e da disfunção metabólica, o estado de inflamação crônica relacionado a obesidade contribui com o desenvolvimento de outras patologias graves, por exemplo doenças virais instigadas pelo HIV ou SARS-Cov-2, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos persiste relevante e urgente. Claramente, pode se argumentar que a compreensão do papel da ativação de inflamassomas em doenças metabólicas ainda possui lacunas a serem preenchidas e contradições a serem esclarecidas. Não obstante, a maioria dos trabalhos publicados foca diretamente no papel do inflamassoma NLRP3 em macrófagos e adipócitos em disfunções metabólicas. Investigações adicionais com enfoque em outras peças chaves associadas a esse importante complexo contribuem para uma melhor compreensão da etiologia de doenças associadas à obesidade. Sendo assim, a primeira parte desse trabalho traz observações a partir de experimentos realizados utilizando um modelo de dieta hiperlipídica em animais deficientes para proteína adaptadora ASC.

Objetivos – capítulo I

Investigar como a ausência da proteína adaptadora ASC em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica influencia no estabelecimento da obesidade e seus fenótipos associados avaliando:

- O acúmulo de gordura abdominal e morfologia do tecido adiposo;
- A tolerância à glicose;
- A alteração da expressão gênica de alvos específicos no tecido adiposo;
- O acúmulo de espécies reativas de oxigênio na cavidade peritoneal;
- A avaliação de esteatose hepática;
- A alteração da expressão gênica e citocinas inflamatórias no fígado;
- As alterações das funções renais e hepáticas.

Metodologia – capítulo I

Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos fêmeas, com idade entre 6 e 9 semanas, pesando de 20 a 23 gramas (g), todos da linhagem C57BL/6, doravante conhecidos como selvagens ou *wild type* (WT), assim como variante geneticamente deficiente para *Asc* (*Asc*^{-/-}) (Sutterwala; Ogura; Szczepanik *et al.*, 2006), com o mesmo *background*. As matrizes de animais *Asc*^{-/-} foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dario Zamboni (USP/RP). Todos os animais foram reproduzidos e acondicionados no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Durante a dieta, os animais foram acondicionados em ambiente livre de patógenos, compartilhando micro isoladores ventilados, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 24° C. O suprimento de água e alimentação estava constantemente disponível. O cuidado com os camundongos estava em conformidade com as diretrizes institucionais sobre ética em experimentos com animais aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB Doc nº 52306/2014.

Indução da obesidade

Após uma semana de aclimatação, animais dos dois genótipos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos para receberem diferentes dietas por 16 semanas (Figura 10). A produção caseira da dieta normolipídica seguiu os parâmetros da dieta de manutenção para animais adultos AIM-93 (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993), ou *standart fat diet* (SFD) e foi utilizada como controle (Tabela 1). Para a indução da obesidade, foi utilizada uma dieta hiperlipídica, ou *high fat diet* (HFD), que consiste na dieta AIM-93 com 45% de lipídeos, também de produção caseira no Laboratório de Imunologia e Inflamação na Universidade de Brasília. O peso dos camundongos e a ingestão alimentar foram monitorados constantemente. Ao final do período da dieta os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente), diluída em solução salina (PBS – *phosphate-buffered saline*) para retirada de sangue do plexo ocular, e eutanasiados em câmara de CO₂ para posterior coleta de sangue, células do lavado peritoneal, e coleta de órgãos. Todos os órgãos após a coleta foram pesados, divididos e armazenados de acordo com a análise subsequente (Figura 10).

Tabela 1- Ingredientes e quantidades (em g/Kg) para produção de rações controle e hiperlipídica

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
Minstura vitamínica	10.000	10.000
L-cistina	3.000	3.000
Bitartrato de colina	2.500	2.500
Hidroquinona	0.014	0.014
Total	4147.600	6454.870

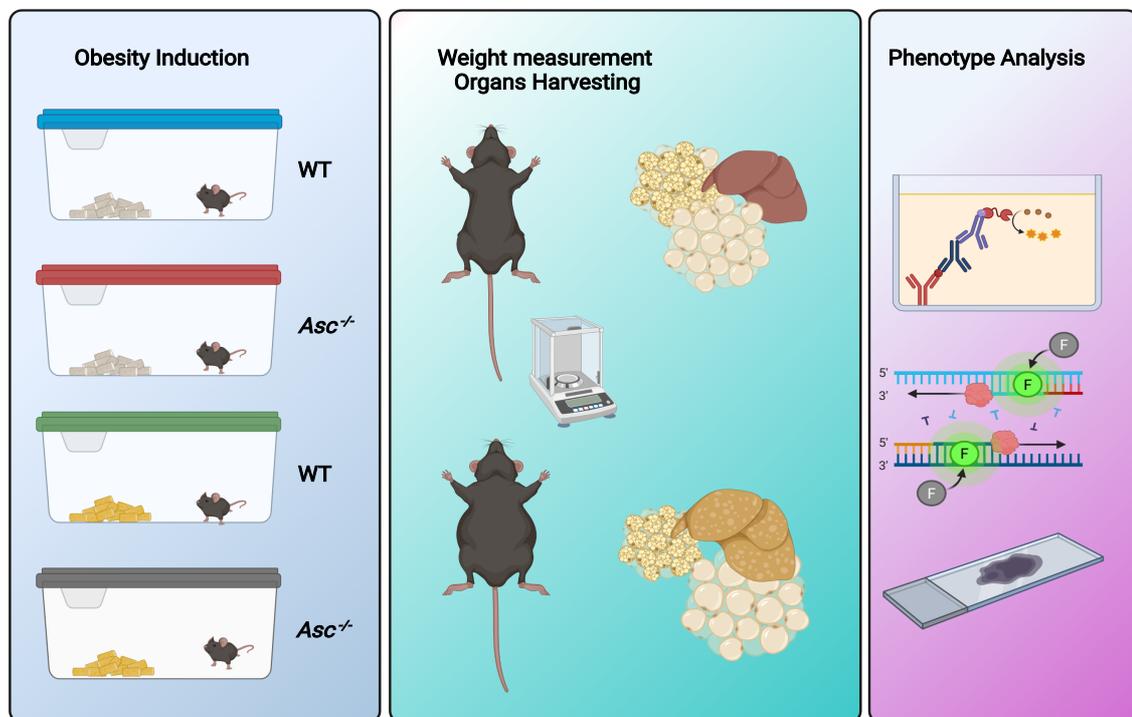


Figura 10 – Etapas para geração de amostras provenientes do modelo de obesidade induzida por dieta.
 Ilustração criada através da plataforma *BioRender* pela autora desse trabalho.

Teste de tolerância à glicose

A resposta periférica à glicose foi avaliada pelo teste de tolerância à glicose (GTT – *glucose tolerance test*). Para garantir que não haja resquício de alimentação, os animais foram acondicionados em novos micros isoladores e mantidos em jejum por 12 horas antes do início do teste. A glicose (1,5 mg/g peso corporal) é administrada por via intraperitoneal, e seus níveis são determinados antes e após 15, 45 e 90 minutos da administração. Foi utilizado ACCU-CHEK Advantage II (Roche Mannheim, Alemanha) para a leitura dos níveis de glicose (Figura 11).

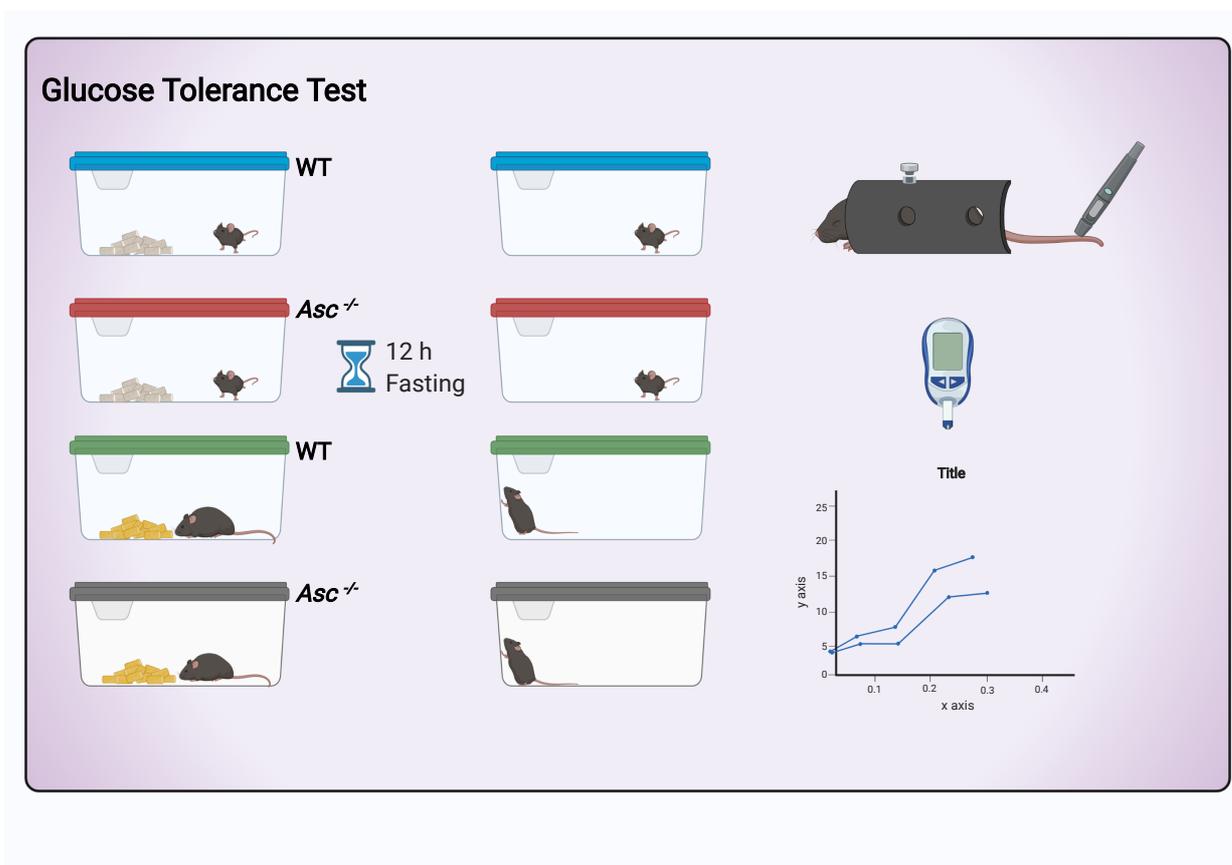


Figura 11 – Delineamento experimental para teste de tolerância a glicose. Ilustração criada através da plataforma *BioRender* pela autora desse trabalho.

Histologia

Os fígados e tecidos adiposos branco e marrom foram coletados, lavados cuidadosamente com PBS e fixados em 10% de formalina. Em seguida, os tecidos foram desidratados e embebidos em parafina. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) (Sigma) seguindo procedimento padrão (Feldman; Wolfe, 2014). As seções foram examinadas por microscópio óptico Zeiss Lab. As fotomicrografias e cores A1 AxioCam 105 foram digitalizadas utilizando o programa ZEN da Zeiss.

Detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo

Células da cavidade peritoneal de animais WT e *Asc^{-/-}* submetidos às diferentes dietas foram coletadas logo após a eutanásia dos animais e incubadas por 30 minutos à 37°C com a sonda *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA Sigma Aldrich). Após a realização de etapas de lavagem as células foram processadas imediatamente no aparelho BD FACS Verse, onde a geração de espécies reativas de oxigênio é avaliada observando-se a conversão da não fluorescente H2DCFDA na espécie fluorescente DCF. Durante a análise de dados no software FlowJo apenas as células viáveis foram consideradas, excluindo ainda a população de agregados ou *doublets*.

Extração de proteínas

As proteínas do fígado foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 1 % de Triton X -100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease, com o auxílio de Almofariz e Pistilo. Para manter a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado por 30 minutos em intervalos de 5 minutos entre cada agitação. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14000g por 15 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em três tubos de eppendorfs por condição experimental.

Dosagem de Citocinas

As citocinas provenientes dos extratos proteicos dos órgãos de camundongos submetidos as dietas foram analisadas pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se kits comerciais (eBioscience e R&D System). No ensaio de ELISA, cada placa de 96 poços foi revestida com 50 µl anticorpos monoclonais específicos de captura diluídos na ausência de proteína carreadora, incubada overnight em 4°C. Após esse período, a placa foi submetida a sucessivas lavagens com PBS/Tween 0,05 %, e bloqueada com 100 µl de PBS/BSA (*bovine serum albumin*) 1% durante 1h em temperatura ambiente. Após esse período, 50 µl das amostras (diluídas 1:10) e a curva padrão com citocinas recombinantes foram adicionadas à placa e incubadas overnight em 4°C. Após a repetição do processo de lavagem o anticorpo de detecção específico de cada citocina foi adicionado, e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 2h. A placa foi então lavada novamente, seguido da adição de 50 µl solução de conjugado estreptavidina-HRP (*horse radish peroxidase*) e incubação por 30 min a temperatura ambiente. Após nova repetição do ciclo de lavagens o substrato (avidina-peroxidase) foi adicionado e incubado em temperatura ambiente por 20 min ao abrigo da luz, a reação foi bloqueada adicionando-se 25 µl de 1M H₂SO₄. A leitura da absorbância foi dada no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA) a 450 nm. Os dados foram analisados através do programa SoftMaxPro, com a concentração de citocinas sendo gerada a partir de interpolação com a curva padrão e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL).

Extração de RNA e síntese de cDNA

Essa etapa, assim como a PCR quantitativa, foi realizada em colaboração com o Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências biomédicas da USP no laboratório do Prof. Dr. Niels Câmara. Amostras de tecidos adiposos e fígados foram submetidos à extração de RNA utilizando o reagente TRizol® (Life Technologies, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A preparação do DNA complementar (cDNA) a partir de 2 µg de RNA diluído em água ultrapura, foi realizada utilizando-se 0.8 µL da transcriptase reserva M-MuLV. Também foram adicionados ao mix: 4 µL de tampão de reação 5x, 2 µL de dNTPs 10 mM, 32 U/ µL do inibidor de ribonuclease RiboLock™ (*Fermentas*, EUA) e 320 ng de iniciadores oligo-dT (*Integrated DNA Technologies*, USA), sequência curta de 15 bases de

timidina, que se anela à cauda de poliadenina do RNA mensageiro. A solução final é incubada em termociclador a 42 °C por 1 hora, seguindo o ciclo com 70 °C por 10 minutos. O cDNA resultante foi diluído em água ultrapura e armazenado em -20 °C.

PCR quantitativa (qPCR)

A quantificação da expressão gênica de diferentes genes de interesse foi feita a partir do preparo de um mix contendo o reagente *Power SYBR® Master Mix* (Life Technologies - EUA) – que contém nucleotídeos livres, corante intercalante SYBR® Green, enzima DNA polimerase e seu respectivo tampão; os pares de iniciadores de cada gene específico, apresentados na tabela 2 e as amostras diluídas de cDNA. Os resultados foram obtidos utilizando-se os valores do ciclo limitante (C_T , *threshold cycle*) para o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001), normalizados pela expressão relativa de mRNA do gene de expressão constitutiva *Actb* (β -actin). Os valores finais foram apresentados em variação numérica linear em relação a mesma.

Tabela 2- Sequência de Iniciadores para qPCR

HUGO Gene ID	UniProt Proteína ID	Sequência de Iniciadores - Primers		Fragmento (pb)
		Senso/Forward	Antissenso/Reverse	
Lipe	Hormone-sensitive lipase	5'-AACTCCTTCCTGGAAG-3'	5'-CTTCTCAAGGTATCTGTGC-3'	153
Irf4	Interferon regulatory factor 4	5'-CAAAGCACAGAGTCACCTGG-3'	5'-TGCAAGTCTCTTTGACACACA-3'	98
Pgc1a	Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha	5'-GAATCAAGCCACTACAGACACCG-3'	5'-CATCCCTCTTGAGCCTTTCGTG-3'	136
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	5'-TGCAGGTTCTACTTTGATCGC-3'	5'-CTGCTCCACACTATGAAGACA-3'	113
Cpt1a	Carnitine O-palmitoyltransferase 1	5'-GGGAGGAATACATCTACCTG-3'	5'-GAAGACGAATAGGTTTGAGTT-3'	183
Acly	ATP-citrate synthase	5'-CCCAAGATTCAGTCCCAAGT-3'	5'-CGTCTCGGGAACACACGTAG-3'	144
Atcb	Actin	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATG-3'	154

Análise Bioquímica do Soro

As amostras de sangue foram coletadas do plexo ocular e transferidas para microtubos Vacuette[®], contendo acelerador de coágulo e separador de soro em gel, e em seguida foram centrifugadas por 20 min a 2000 RPM (rotações por minuto). As alíquotas de soro foram separadas para análises de funções do fígado e rim, e para o perfil lipídico. Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina K, uréia, colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL foram medidos pelo analisador químico automatizado ChemWell-T[®] (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), utilizando kits comerciais Labtest[®].

Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média com erro padrão da média (*SEM – standart error of the mean*) ou desvio padrão (*SD – standart deviation*) como indicado em cada legenda. Os testes D'Agostino-Pearson ou Anderson-Darling foram utilizados para análise de resíduos afim de verificar se os dados possuíam distribuição Gaussiana. Por fim, foi executado o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste de Tukey, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0.05$. Toda a análise estatística e elaboração dos gráficos foi realizada no software Graphpad Prism.

Resultados – capítulo I

Estabelecimento da obesidade a partir de ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos WT e *Asc*^{-/-}

Com o intuito de demonstrar o papel da proteína adaptadora ASC no desenvolvimento da obesidade, inicialmente, submetemos camundongos WT e *Asc*^{-/-} à dieta padrão (normolipídica) ou hiperlipídica por 16 semanas. Apesar de diferentes modelos de dieta serem utilizados para o estabelecimento da obesidade em roedores, animais C57BL/6J alimentados com HFD apresentam um maior ganho de peso, hiperglicemia e hiperinsulinemia, constituindo, portanto, um bom modelo para mimetização de disfunções metabólicas (Wang; Liao, 2012). Os resultados apresentados indicam que a dieta com elevados níveis de gordura foi eficiente para indução do modelo de obesidade nos dois genótipos estudados. Ao final das 16 semanas de alimentação hiperlipídica é possível ver um aumento claro no peso dos animais de ambos os grupos ao comparar com seus respectivos grupos controles sob dieta padrão (Figura 12 A e C). Durante as primeiras semanas de alimentação o ganho de peso entre os grupos que recebem HFD é bastante similar, entretanto, a partir da sétima semana, é possível observar que os animais do grupo *Asc*^{-/-} passam a apresentar uma variação maior no ganho de peso do que a apresentada pelo grupo de animais WT (Figura 12A e 1B). Ao final do período de indução da obesidade, animais HFD - *Asc*^{-/-} apresentam um ganho de peso significativamente maior do que animais HFD – WT. Foi possível também observar que o acúmulo de gordura abdominal dos animais knockouts também foi maior quando comparado aos demais (Figura 12D).

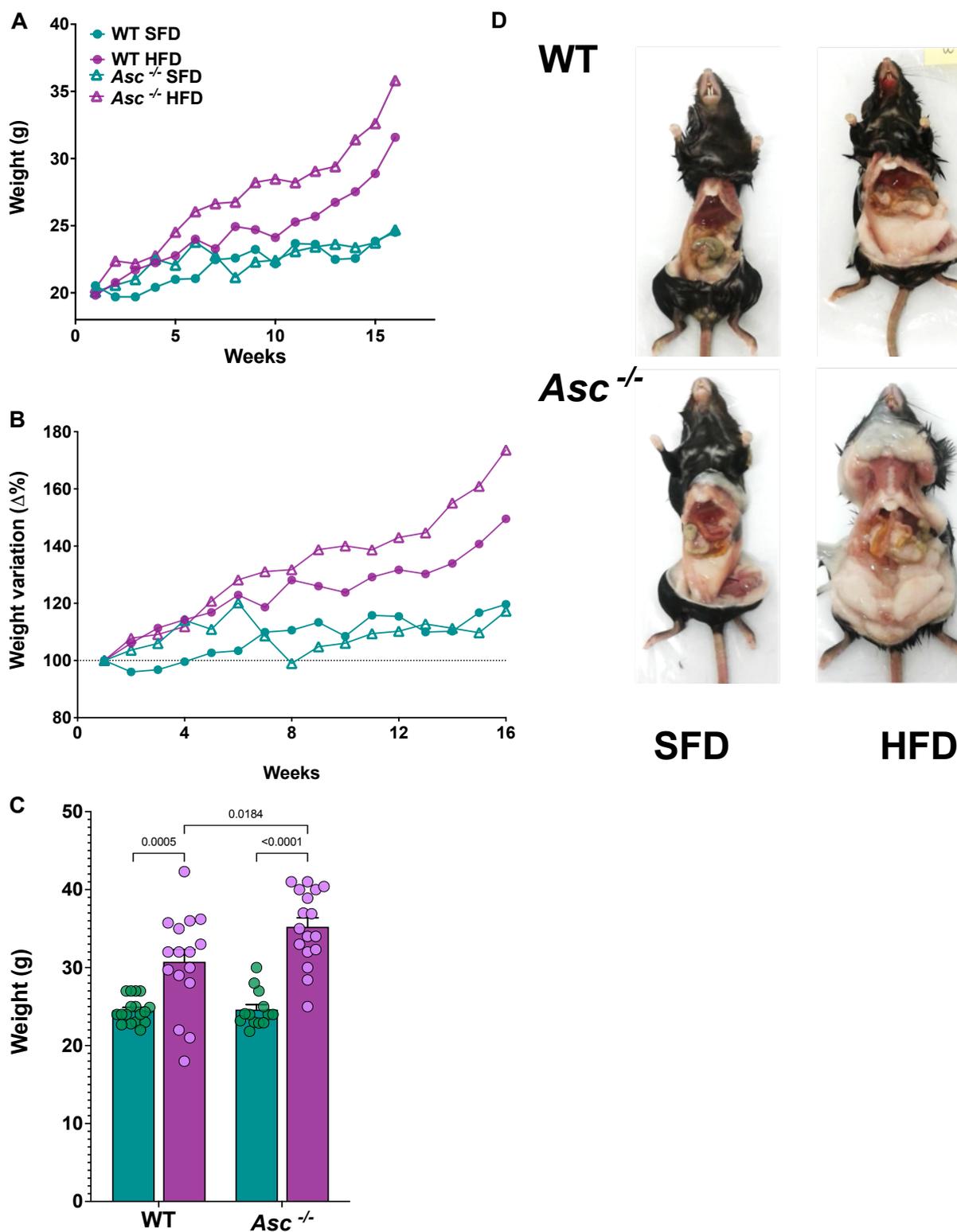


Figura 12- Análise de ganho de peso de camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas tiveram seu peso mensurado semanalmente (A). Representação do aumento de peso a partir de análise de variação em porcentagem (B). Peso total dos animais no último dia de indução de obesidade, cada símbolo representa um animal diferente (C). Fotografia de um animal representativo de cada grupo retirada no dia da eutanásia para ilustrar diferentes quantidade de acúmulo de tecido adiposo abdominal (D). Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

A fim de corroborar os resultados anteriores, avaliamos, através de cortes histológicos, se alterações morfológicas poderiam ser relacionadas com o aumento de peso ou ausência de ASC (Figura 13). Para análise de tecido adiposo, foram coletados tanto o tecido adiposo marrom da região supraescapular quanto o tecido adiposo branco da região abdominal. Não houve diferença entre o peso do tecido adiposo marrom de todos os quatro grupos. Como esperado, houve um aumento significativo do tecido adiposo branco nos dois grupos que receberam dieta hiperlipídica. Contudo, ao comparamos os dois grupos de indução da obesidade, encontramos uma diferença significativa entre os genótipos, o maior peso sendo encontrado nos animais *Asc*^{-/-}.

Com relação a morfologia, notamos apenas um ligeiro aumento no tamanho dos adipócitos proveniente do BAT do grupo WT - HFD comparado ao grupo WT - SFD. Entretanto, é possível perceber um aumento expressivo do tamanho dos adipócitos do tecido adiposo marrom de camundongos *Asc*^{-/-} obesos em relação aos mesmos animais submetidos a dieta padrão, caracterizando um processo de branqueamento do tecido adiposo marrom. Como já era esperado, HFD induziu uma maior aumento do peso total do tecido branco visceral em animais obesos de ambos genótipos.

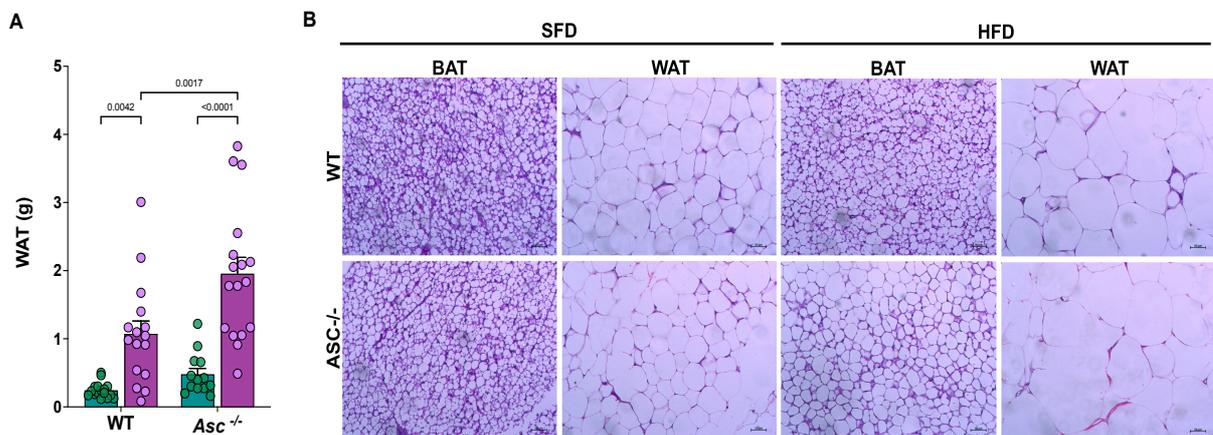


Figura 13 - Análise de peso e morfologia de tecidos adipoisos em camundongos WT e *Asc* KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas e tiveram os tecidos adiposos branco e marrom coletados e pesados, cada símbolo representa um animal diferente (A). Imagens histológicas com hematoxilina e eosina (H&E) de fragmentos dos dois tecidos adiposos (B). Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Efeitos da dieta hiperlipídica na tolerância à glicose em camundongos WT e *Asc*^{-/-}

Alterações nos processos de metabolização de glicose estão intimamente ligados com disfunções metabólicas como a obesidade (Singla; Bardoloi; Parkash, 2010), sendo assim, após as 16 semanas de dieta, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT). Como esperado, 15 minutos após a injeção observamos um pico na glicose circulante em todos os grupos, entretanto é evidente que esse aumento é muito maior nos grupos que receberam HFD (Figure 14A). Esse dado é confirmado quantitativamente ao analisarmos a área sob a curva separadamente de cada animal e compilarmos todos os valores em um único gráfico (Figure 14B). Apesar dos dados anteriores mostrarem que o grupo *Asc*^{-/-} HFD apresentava um peso maior no dia do ensaio, não encontramos diferença entre os dois genótipos sob HFD de modo geral. Apenas os valores encontrados após 90 minutos da aplicação de glicose que apresentam uma diferença entre os grupos WT e *Asc*^{-/-} submetidos à HFD (Figure 14E).

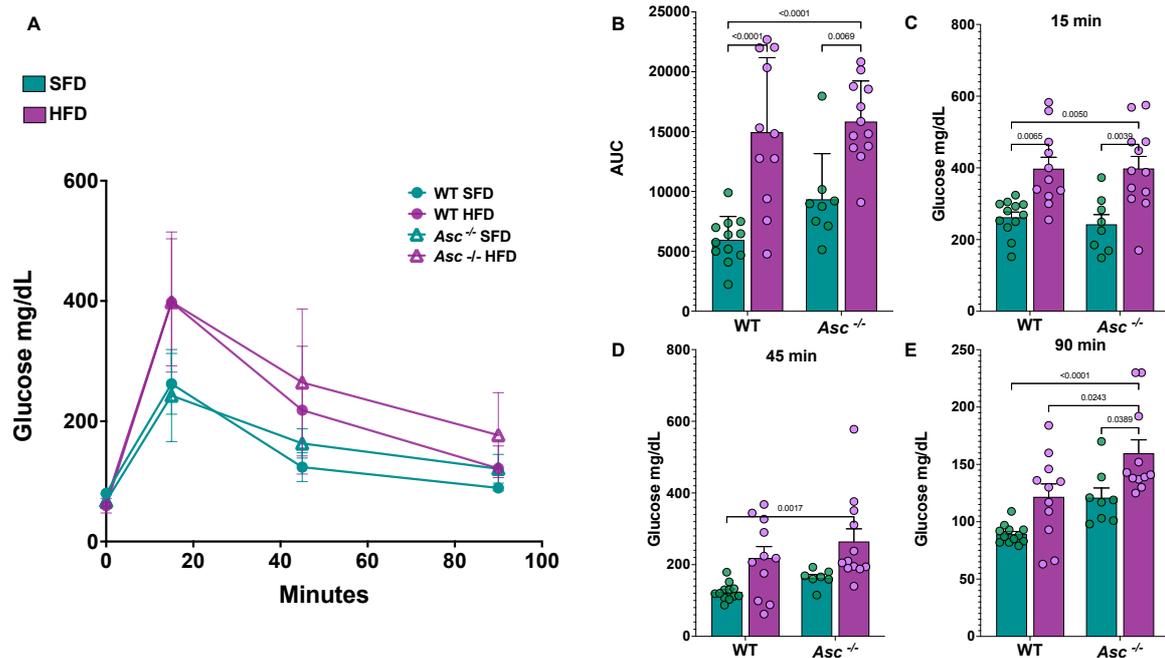


Figura 14 - Teste de tolerância à glicose em camundongos WT e *Asc* KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas foram mantidos em jejum por 12 horas e submetidos ao teste de tolerância a glicose (GTT). Foram injetados 1,5 mg/mL peso corporal de glicose intraperitoneal e os níveis circulantes foram mensurados nos tempos 15, 45 e 90 minutos após a injeção. Curva de tolerância a glicose ao longo do tempo (A). Cálculo de área sob a curva do teste realizado em cada animal separadamente (B). Comparações entre os grupos em cada um dos tempos específicos de avaliados (C - E). Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Análise da expressão gênica associada ao metabolismo lipídico em BAT e WAT de animais WT e *Asc*^{-/-} após dieta hiperlipídica

Disfunções da expressão gênica de alvos específicos em BAT podem se associar a um estabelecimento mais efetivo de disfunções metabólicas (Omran; Christian, 2020). Ao analisarmos a expressão de *Irf4* em BAT, primeiro observamos que, não surpreendentemente, houve uma redução da expressão em animais WT influenciada pela dieta hiperlipídica. O mesmo não ocorre na ausência de ASC, já que para o animal knockout não há expressão diferencial entre os grupos com dieta controle e hiperlipídica. É importante notar que existe uma diferença clara entre os dois genótipos ao se comparar apenas a dieta controle, com níveis reduzidos no grupo *Asc*^{-/-} (Figura 15A). A indução da obesidade não influenciou a expressão de *Pgc1a* (PPARG coativador 1) no BAT de animais WT. Entretanto, quando comparamos a diferença entre os dois genótipos, observa-se que na ausência da proteína ASC existe um aumento da expressão de *Pgc1a* em animais que receberam a dieta HFD (Figura 15B). A expressão de PPAR- γ também não foi influenciada pela dieta ao avaliarmos o BAT de animais WT. O que encontramos são maiores valores de expressão de PPAR- γ dentre os quatro grupos são apresentados pelos animais *Asc*^{-/-} SFD, entretanto, essa diferença só é estatisticamente significativa quando comparada com os animais WT que também receberam SFD (Figura 15C).

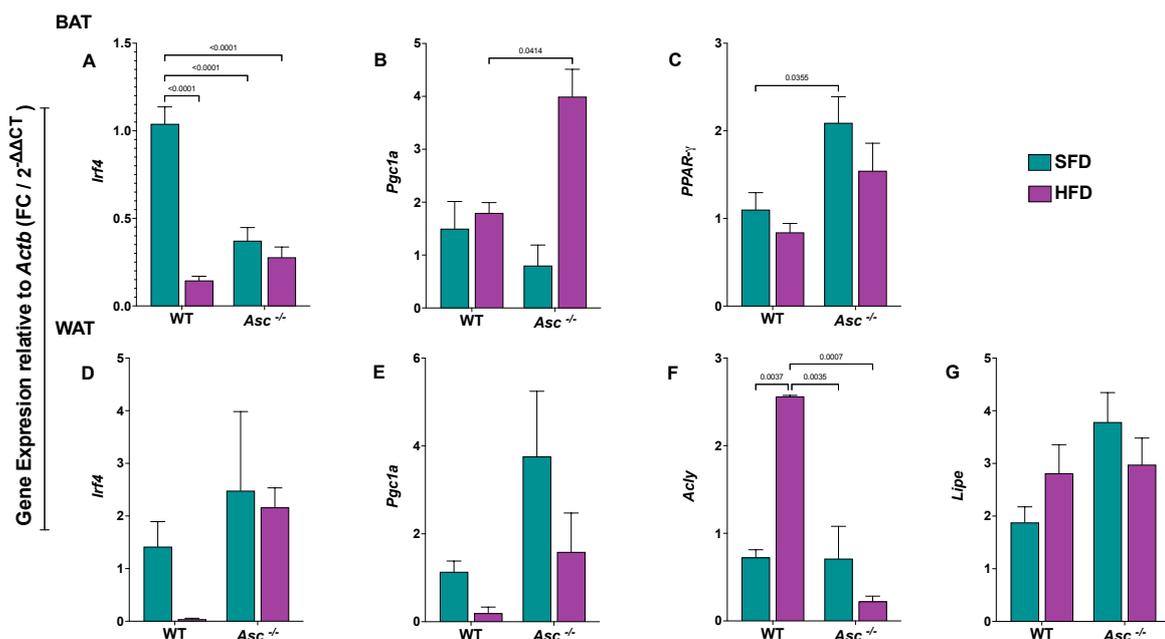


Figura 15 - **Expressão gênica dos tecidos adiposos marrom e branco.** Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas e tiveram os tecidos adiposos branco e marrom coletados e RNA extraído com Trizol. Em posterior análise foi avaliada a expressão dos genes *Irf4*; *Pgc1- α* e PPAR- γ para

BAT (A - C) e *Irf4*, *Pgc1- α* , *Acly* e *Lipe* para WAT (D-G). A expressão relativa dos genes é dada a partir de normalização com gene de expressão constitutiva *Hprt*. Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Avaliamos a expressão gênica de *Irf4* e *Pgc1 α* também no WAT desses animais, juntamente com a expressão de *Acly* e *Lipe*. Para *Irf4*, novamente encontramos uma redução na expressão dependente da dieta em animais WT. Analisando o efeito da ausência de ASC os testes estatísticos não indicam que exista alguma diferença, porém, vale a pena ressaltar que a alta dispersão dos dados dentro desses grupos pode ter influenciado a resposta ao teste (Figura 15D e E). Também avaliamos a expressão do gene responsável pela codificação da proteína ACLY (ATP-citrate lyase) em WAT, considerando que já se discute uma correlação entre a atuação desse regulador epigenético com a homeostase metabólica e progressão da obesidade (Fernandez; Viola; Torres *et al.*, 2019). Não encontramos diferenças que poderiam ser atribuídas apenas ao genótipo dos animais ao analisar os dois grupos que receberam a dieta controle. Porém, o aumento na expressão de *Acly* ao receber HFD esteve presente apenas nos animais WT (Figure 15F). Por fim, não houve diferença significativa ao avaliarmos a expressão de *Lipe*, responsável por codificar a proteína lipase hormônio sensível em nenhum dos grupos estudados (Figure 15G).

Diferença no aumento da produção de ROS em células da cavidade peritoneal a partir de ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos WT e *Asc*^{-/-}

Tradicionalmente, a obesidade é relacionada com um aumento de ROS, que acabam por oxidar macromoléculas como proteínas, lipídeos, ou ácidos nucleicos, modificando sua estrutura e função (Jiang; Lim; Morris *et al.*, 2011). Ao avaliarmos células da cavidade peritoneal quanto à geração de espécies reativas de oxigênio podemos observar que a obesidade induziu um aumento de ROS nos dois genótipos, entretanto os animais WT HFD apresentaram uma indução muito maior que os animais *Asc*^{-/-} HFD (Figura 16).

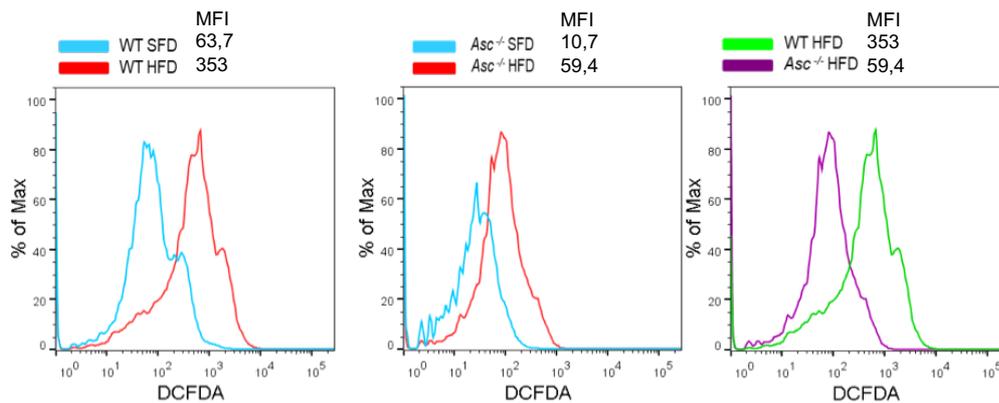


Figura 16 – Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células da cavidade peritoneal em animais submetidos a HFD. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas e tiveram 3 mL de meio de cultura injetados em suas cavidades peritoneais para coleta das células ali presentes. As células foram então incubadas com a sonda DCFDA e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse. Histogramas gerados a partir de análise de *singlets* no software FlowJo após aquisição. MFI: *mean fluorescent intensity*.

Efeitos da dieta hiperlipídica no fígado de camundongos WT e *Asc*^{-/-}

Um funcionamento saudável do fígado é essencial para a manutenção da homeostase metabólica. O desenvolvimento da obesidade pode ser diretamente associado a um maior risco de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), sendo a esteatose a característica inicial marcante de seu estabelecimento. Alterações morfológicas e funcionais nesse órgão constituem um importante campo de observação para compreensão dos mecanismos envolvidos durante disfunções metabólicas.

Animais com ausência de ASC apresentaram aumento significativo no peso de fígado quando submetidos a HFD. Corroborando esse fato, apesar de ser possível visualizar que a dieta hiperlipídica induziu certo nível de esteatose no fígado de animais WT, esse efeito foi muito mais intenso em animais *Asc*^{-/-} (Figura 17).

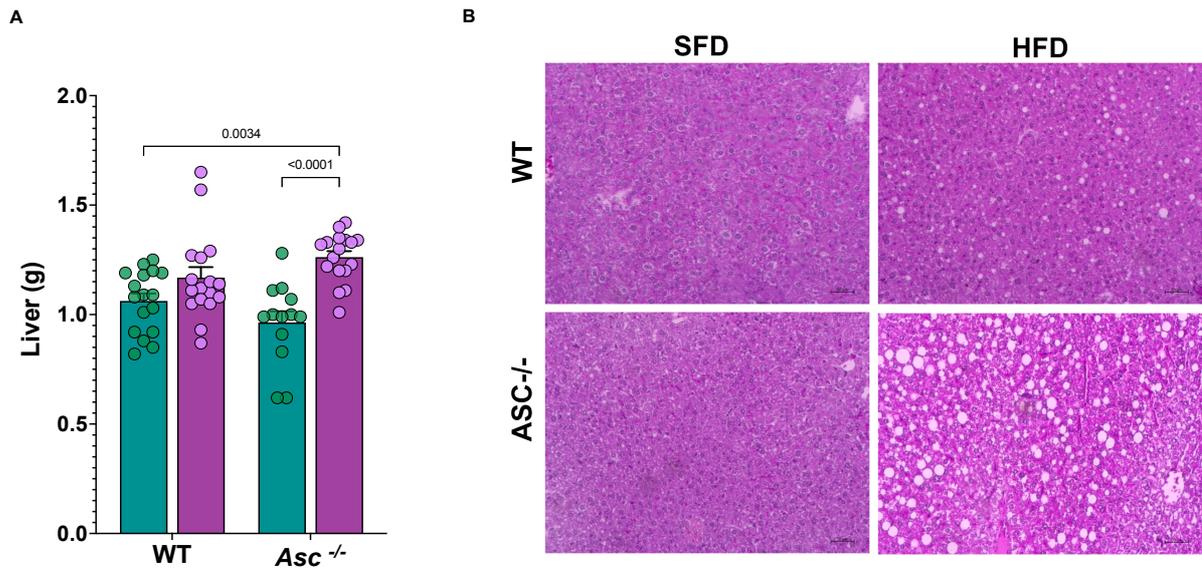


Figura 17 - Análise de ganho de peso e morfologia do fígado em camundongos WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas e tiveram os fígados coletados e pesados, cada símbolo representa um animal diferente (A). Imagens histológicas com hematoxilina e eosina (H&E) de fragmentos do fígado representativos do grupo (B). Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Outro ponto importante a se observar é a correlação entre obesidade e aumento do perfil inflamatório no fígado. Após coleta e pesagem, além das análises histológicas, partes do fígado foram também utilizadas em extração de proteínas, onde analisamos a presença de citocinas por ELISA (Figura 18). Assim como avaliação de expressão gênica por qPCR após extração de DNA (Figura 19). Em animais WT observamos um aumento apenas na presença de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) em animais que receberam HFD, apesar de apresentarem valores ainda similares ao analisarmos a presença de CCL2 (*chemotactic C-C motif chemokine ligand 2*) e TNF- α . Entretanto, curiosamente, o resultado mais inesperado foi observado em animais Asc^{-/-} HFD. Como esse grupo apresentou um fenótipo de obesidade maior que o grupo WT, era esperado que isso se manifestasse juntamente com um aumento de inflamação no fígado dos mesmos. Apesar disso, o que encontramos foi uma redução nos níveis de CCL2 e TNF- α ao comparamos com o grupo Asc^{-/-} SFD, e também uma redução comparada ao grupo WT HFD quando analisamos GMCSF.

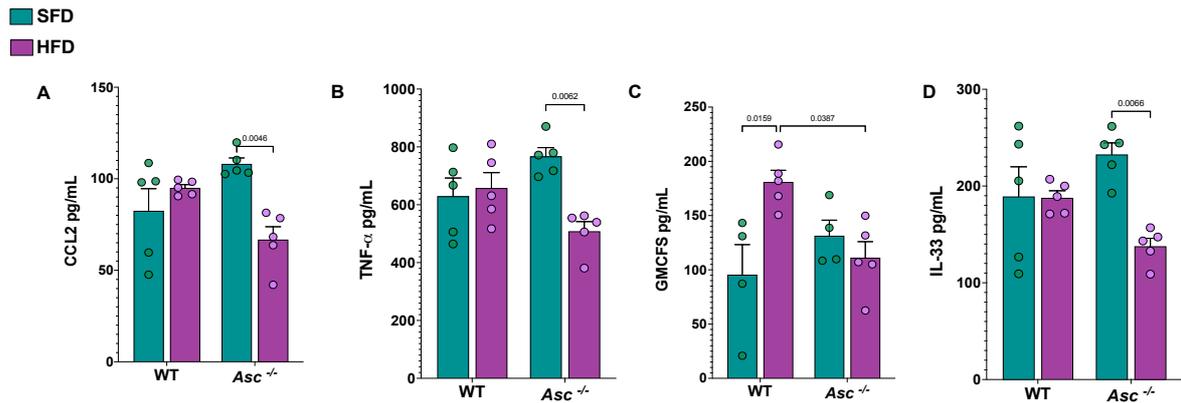


Figura 18 - Quantificação citocinas encontradas em macerados do fígado de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas tiveram os fígados coletados e submetidos a maceração em tampão apropriado para extração de proteínas. Amostras de proteínas diluídas foram utilizadas para quantificação de CCL3, TNF- α , GMCSF e IL-33 por ELISA. Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

O papel da citocina IL-33 durante a homeostase ou desenvolvimento de distúrbios metabólicos é um ponto de muita discussão na literatura devido ao papel dúbio que essa citocina muitas vezes apresenta. Quando avaliamos o grupo WT, não encontramos nenhuma diferença, porém, como previamente mencionado, houve uma dispersão muito grande nos dados no grupo WT SFD. Em animais com ausência da proteína ASC, foi mantido o mesmo perfil das outras citocinas avaliadas, com uma diminuição em camundongos que receberam HFD.

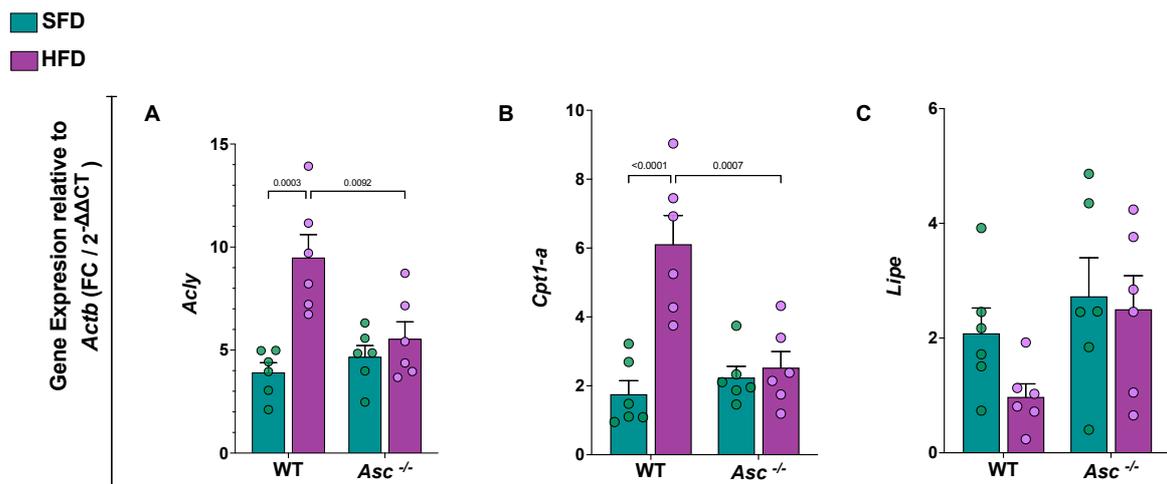


Figura 19- Expressão gênica no fígado de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas tiveram os fígados coletados e o RNA extraído com Trizol. Em posterior análise foi avaliada a expressão dos genes Acly, Ctpa-1 e Lipe. A expressão relativa dos genes é dada a partir de normalização com gene de expressão constitutiva Hprt. Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Para análise de expressão gênica no fígado, novamente analisamos a expressão de *Acly* e *Lipe* e adicionamos à análise de *Cpt1-a*, codificador da proteína de mesmo nome envolvida no metabolismo da oxidação de ácidos graxos (Schlaepfer; Joshi, 2020). A expressão de *Acly* seguiu o mesmo padrão observado no tecido adiposo branco, com aumento dos níveis nos animais do grupo WT HFD e ausência de alteração nos animais do grupo com ausência de ASC (Figura 18A), fenótipo que foi repetido também para expressão de *Cpt1-a* (Figura 18B). Novamente, a alta dispersão dos dados pode ter influenciado uma análise mais precisa, porém, não atestamos nenhuma diferença de expressão de *Lipe* para todos os grupos avaliados (Figura 18A).

Efeitos da dieta hiperlipídica nas funções renal e hepática de camundongos WT e *Asc*^{-/-}

A progressão da esteatose hepática pode ser acompanhada por danos as funções hepática e renal. Essas funções podem ser avaliadas através de alterações nos níveis de ALT, AST, creatinina K e ureia no sangue periférico. Ao compararmos os níveis dessas moléculas em animais WT e *Asc*^{-/-} submetidos a HFD encontramos o aumento esperado apenas em animais *Asc*^{-/-}. O mesmo ocorre ao analisarmos o perfil lipídico nas mesmas amostras de soro, onde o aumento de colesterol e triglicerídeos esteve presente apenas em animais *Asc*^{-/-}. Repetições desses ensaios são necessárias afim de confirmar o fenótipo inesperado encontrado em animais WT.

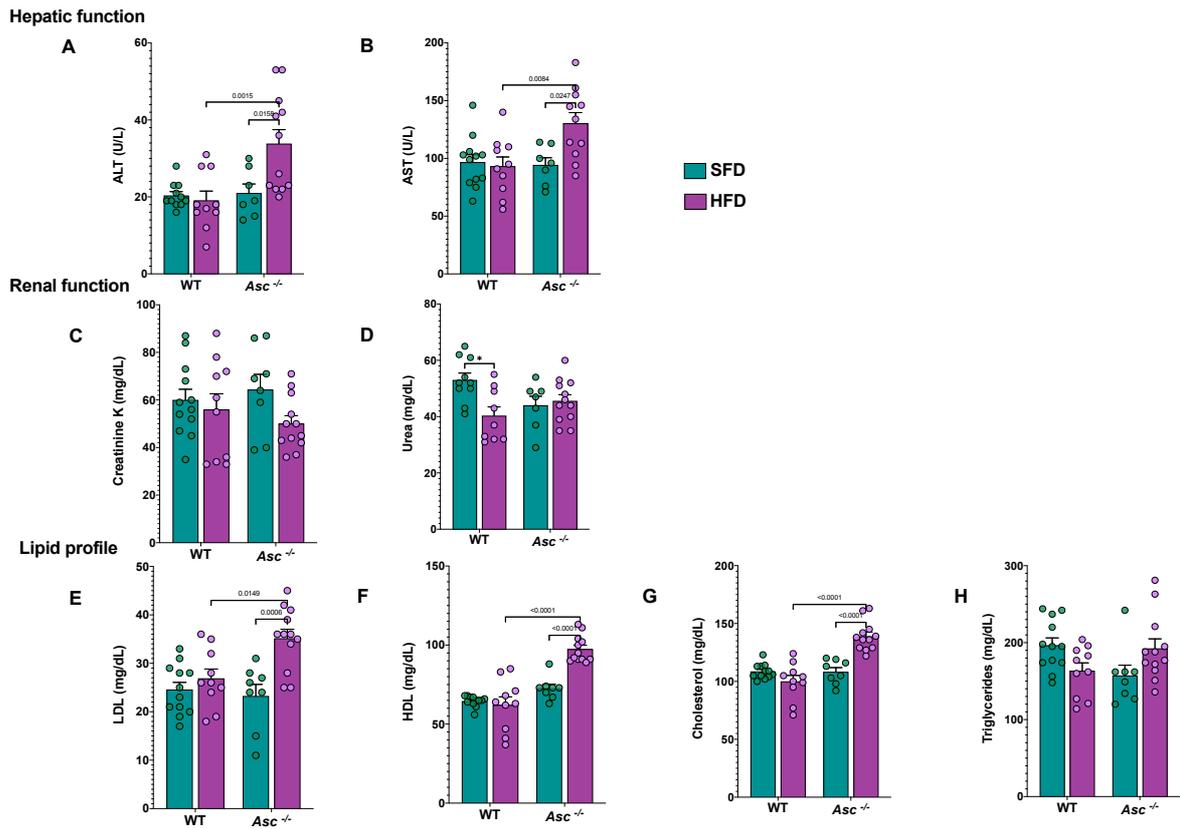


Figura 20 – Análise de função hepática, renal e perfil lipídico do plasma do soro de animais WT e Asc KO submetidos a dieta padrão ou hiperlipídica. Animais alimentados com SFD, 17% de gordura, ou HFD, 45% de gordura, por 16 semanas. Avaliação da função hepática através da mensuração de ALT(A) e AST(B); da função renal por creatinina K (C) e ureia (D) e perfil lipídico com LDL (E), HDL (F), colesterol (G) e triglicérides (H). Os dados são expressos como média em conjunto com erro padrão da média (SEM). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações, sendo representados apenas valores de $p < 0.05$.

Discussão/Conclusões – capítulo I

A inflamação está completamente envolvida nos processos fisiológicos do estabelecimento da obesidade e outras desordens metabólicas. Considerando a relevância dos complexos inflamassomas, a relação de cada um de seus componentes com a progressão dessas doenças tem sido amplamente estudada. Encontramos aqui que na ausência de ASC, camundongos que receberam uma dieta hiperlipídica apresentaram um maior ganho de peso e também acúmulo de gordura na região abdominal. Durante a montagem dos complexos multiproteicos para ativação dos inflamassomas, um dos domínios de ligação da proteína ASC, CARD, é responsável por se ligar a pró-Caspase 1, levando em conta a interação fundamental dessas duas proteínas, nossos resultados podem se relacionar com outros achados onde, animais *knockout* para Caspase-1 apresentaram um maior ganho de peso após receberem dieta hiperlipídica (Wang; Capell; Yoon *et al.*, 2014) (Kimura; Karasawa; Usui *et al.*, 2016). Observamos ainda em animais *Asc*^{-/-} um maior acúmulo de gordura abdominal, assim como encontrado previamente também em animais *knockout* para Caspase-1 (Dixon; Flask; Papouchado *et al.*, 2013).

Quando o tecido adiposo não é mais capaz de estocar todo o excesso de nutrientes, deposições de gordura passam a acontecer em outros órgãos, como fígado, coração, pâncreas entre outros. Houve um aumento no peso do fígado nos animais obesos dos dois grupos analisados. Esse aumento de peso foi seguido do surgimento de uma esteatose no órgão que foi muito mais evidenciada no fígado de animais *Asc*^{-/-} submetidos a HFD. O surgimento de esteatose aumenta o risco de desordens metabólicas ligadas a obesidade como: dislipidemia, hipertensão e diabetes. O papel de proteínas do complexo inflamassoma na progressão de esteatose deve ser avaliado de forma individual já que vários estudos reportam diferentes aspectos dessa relação. Por exemplo, determinado estudo demonstrou a necessidade da proteína NLRP3 para o desenvolvimento de esteatose hepática (WREE e colab., 2014). Entretanto, animais *Asc*^{-/-} e *Caspase-1*^{-/-} alimentados com uma dieta deficiente em metionina e colina mostraram um aumento de esteatose hepática, assim como maiores níveis das enzimas hepáticas ALT e AST (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, respectivamente), o que vai de acordo com os nossos resultados (HENAO-MEJIA e colab., 2012). Diferenças entre as dietas utilizadas, tempo de alimentação, idade, sexo e coabitações constantemente aparecem como possíveis causas para a ampla divergência de estudos.

Todavia, a análise de citocinas pró-inflamatórias e expressão de fatores de transcrição no fígado de animais *Asc*^{-/-} apontaram para uma direção inesperada, da diminuição do fenótipo

pró-inflamatório associado a obesidade. CCL2 e GM-CSF estão incluídas no grupo de citocinas clássicas que contribuem para aumento e manutenção da inflamação crônica durante a obesidade, principalmente devido à influência direta que essas possuem em relação ao recrutamento e ativação de células do sistema imune. Associações diretas sobre as flutuações nos níveis de Il-33 dentro do contexto de desordens metabólicas são complexas, uma vez que o papel dessa citocina está sempre sendo colocado como dúvida (de Oliveira; Talvani; Rocha-Vieira, 2019). Considerando que nesse trabalho a diminuição de seus níveis segue o padrão apresentado pelas outras citocinas analisadas, isso sugere que sua modulação é mais uma das consequências do fenômeno global que ocorre no nosso modelo. Todavia, apenas a execução de experimentos adicionais poderia esclarecer esse ponto de forma conclusiva.

Elevações nos níveis de expressão de *ATP-citrate lyase* hepática e no tecido adiposo branco em animais *db/db* evidenciam como o papel dessa enzima para biossíntese de lipídeos pode correlacionar-se diretamente com o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (Wang; Jiang; Wang *et al.*, 2009). Essencial no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para oxidação na mitocôndria, a enzima *Carnitine palmitoyltransferase 1* também já teve sua expressão positivamente correlacionada com ganho de peso (Warfel; Vandanmagsar; Dubuisson *et al.*, 2017). No presente trabalho, mais uma vez indo na contramão do fenótipo encontrado para o animal WT, *Asc*^{-/-} submetidos a dieta rica em gordura, apesar de apresentarem peso mais elevado, mostram redução nos níveis de expressão de *Cpt1-a* e *Acly* no fígado, bem como de *Acly* no tecido adiposo branco. No presente trabalho ao analisar células peritoneais também encontramos uma queda nos níveis de ROS no grupo *Asc*^{-/-} HFD, que apesar de também não ser o padrão em estudos com HFD, nesse caso pode se associar a menor ativação dos inflamassomas nesse modelo. A literatura apresenta que para ativação do inflamassoma NLRP3 pela via canônica (processo dependente de ASC) ocorre elevação dos níveis mitocondriais de NOX 4 (*NADPH oxidase 4*). Aumento de NOX4 promove produção de ROS que por sua vez amplia os níveis de CPT1A (Moon; Nakahira; Chung *et al.*, 2016). Porém, para melhor elucidar se essa associação também poderia acontecer com os dados aqui apresentados, é necessário avaliar as taxas de ROS diretamente nos hepatócitos de animais *Asc*^{-/-} HFD.

Ao analisar a modulação da expressão gênica no tecido marrom, talvez o mais importante a se destacar é o aumento da expressão de *Pgc-1a*, primeiramente identificado como regulador da termogênese adaptativa, mas também envolvido na regulação da biogênese mitocondrial, oxidação fosforilativa e metabolismo de ácidos graxos. Em indivíduos obesos, redução dos níveis de mRNA de *Pgc-1a* já foi associada a marcadores inflamatórios, tolerância

a glicose e resistência à insulina, o que de certa forma condiz com os dados encontrados em nosso modelo (Semple; Crowley; Sewter *et al.*, 2004) (Hammarstedt; Jansson; Wesslau *et al.*, 2003).

Um fenótipo semelhante ao observado nesse trabalho ocorreu em um estudo onde animais *knockout* para o receptor MyD88 submetidos a obesidade induzida por dieta, também, apesar do fenótipo mais obeso, apresentaram uma redução na expressão gênica de IL-6, TNF- α e IL-1 β (CASTOLDI e colab., 2017). Após análise proteômica dos animais *MyD88*^{-/-} a fim de identificar proteínas diferentemente expressas no tecido adiposo e fígado desses animais, os autores encontraram que moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico eram diferentemente expressas. O mecanismo proposto acabou então por relacionar que a ausência de MyD88 regula um aumento da expressão de Dectina-1, que acaba por influenciar toda regulação inflamatória do tecido adiposo desses animais. Ademais, é possível argumentar sobre a possibilidade de obesidade metabolicamente saudável para animais *Asc*^{-/-}, já que o aumento de peso total é acompanhado de diminuição de parâmetros inflamatórios. Entretanto, um dos parâmetros marcantes que definem esse *status* é justamente o menor acúmulo de gordura ectópica, e no presente trabalho, animais *Asc*^{-/-} mostram maiores níveis de esteatose hepática além de aumento nos níveis de ALT e AST. Ainda assim, é possível se contra argumentar que a obesidade metabolicamente saudável não é um estado sempre fixo e pode evoluir para o quadro de desregulação metabólica completa. Dessa forma, seria possível apresentar a hipótese de que animais *Asc*^{-/-} aqui estudados poderiam estar em um estado de transição entre os dois fenótipos. Todavia, análises aprofundadas do fígado desses animais, como avaliações do perfil lipídico e proteico global, têm potencial de trazerem indicativos para desvendar os mecanismos por trás do fenótipo aqui observado.

CAPÍTULO II

Macrófagos de tecido adiposo podem compreender até 40% das células no tecido adiposo obeso e representam uma fonte rica de citocinas (Osborn; Olefsky, 2012). Focos inflamatórios caracterizados por *crown-like structures* (CLS), que consistem em adipócitos mortos cercados por macrófagos (Murano; Barbatelli; Parisani *et al.*, 2008), inicialmente foram identificados na gordura visceral e subcutânea, e mais recentemente foram observados em tecido adiposo branco da mama de mulheres e ratas obesas (Morris; Hudis; Giri *et al.*, 2011) (Subbaramaiah; Howe; Bhardwaj *et al.*, 2011). 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 (Shapiro; Pecht; Shaco-Levy *et al.*, 2013). Como consequência, há a indução da ativação dos macrófagos, via *Toll-like receptor 4* (TLR4), estimulando assim a sinalização de NF- κ B. Este, por sua vez, ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo ciclo-oxigenase-2 (COX2), IL-6, IL-1 β , e fator de necrose tumoral α (TNF α) (Shi; Kokoeva; Inouye *et al.*, 2006).

A descoberta que a incubação de meio condicionado proveniente de macrófagos ativado com LPS induz resistência à insulina e expressão de lipase em adipócitos foi um dos primeiros marcos no estabelecimento de conexões entre o sistema imune e metabolismo glicolítico. Ambas células imunes e adipócitos podem contribuir para produção de efetores e consequências *downstream* na cascata de ativação do inflamassoma. Entretanto, é provável que sinalizações autócrinas e parácrinas dos efetores de NLRP3 sejam capazes de induzir alterações metabólicas no tecido adiposo. Igualmente interessante de se observar é a recente descrição que diferentes fontes celulares, adipócitos ou células mielóides, de uma mesma citocina no tecido adiposo, são capazes de promover fenômenos metabólicos distintos (Han; White; Perry *et al.*, 2020).

Uma variedade de modelos experimentais para análise dos efeitos de adipócitos e tecido adiposo têm sido elaborados para tentar mimetizar um microambiente celular onde seja analisada a interação entre os adipócitos e as células alvos, sejam essas primárias, de linhagem, imunológicas ou tumorais. Uma boa parte desses modelos trabalha com células-tronco derivadas de adipócitos, a fim de investigar seus efeitos no ambiente celular e avaliar sua potencial aplicação em medicina regenerativa. A maioria desses estudos faz o uso de um modelo co-cultivo, onde existe uma interação direta ou indireta entre os adipócitos e as células-alvo, podendo existir ou não contato físico entre os dois tipos celulares. Ritter e colaboradores avaliaram o efeito de células-tronco derivadas de tecido adiposo cutâneo e visceral em uma

linhagem celular de câncer de mama (Ritter; Friemel; Fornoff *et al.*, 2015). Nesse estudo foi avaliado o contato direto entre as células, bem como o contato entre as células tumorais e meio de cultura dos adipócitos. Ainda assim alterações na viabilidade celular ocorreram, bem como alterações de morfologia e composição do citoesqueleto. Um outro trabalho analisou a interação entre o tecido adiposo e células de câncer gástrico, e observou que o contato entre os dois tipos celulares influenciou a progressão do câncer gástrico, aumentando seu crescimento e capacidade de invasão (Nomoto-Kojima; Aoki; Uchihashi *et al.*, 2011). A utilização no cultivo celular de meio condicionado obtido diretamente a partir do cultivo *ex vivo* do tecido adiposo em sua totalidade é um método conhecido, e seu efeito já foi demonstrado, por exemplo, na captação de glicose por linhagem musculares (Lam; Janovská; McAinch *et al.*, 2011). Em um estudo de fatores secretados do tecido adiposo marrom, o uso de meio condicionado obtido de cultivo *ex vivo* promoveu diretamente a migração de macrófagos M2 (Cereijo; Gavaldà-Navarro; Cairó *et al.*, 2018).

O maior interesse em entender as interações entre adipócitos e células do sistema imune, destacando-se macrófagos, ainda reside em compreender como essa dinâmica se desenvolve e contribui durante disfunções metabólicas. Ao mesmo tempo, é bem estabelecido que durante a homeostase metabólica, as complexas conexões entre adipócitos e células imunes também influenciam outros processos do organismo. Uma melhor compreensão da contribuição desse tecido em processos inflamatórios fora do contexto da síndrome metabólica constitui um desses cenários.

Considerando a função endócrina do tecido adiposo e como a utilização de meios condicionados provenientes desse tecido induzem fenótipos diversos em diferentes cenários, como anteriormente mencionado, a segunda parte desse trabalho foca em entender como produtos de secreção do tecido adiposo podem diretamente influenciar o processo inflamatório previamente estabelecido em macrófagos.

Objetivos – capítulo II

Caracterizar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na comunicação entre tecidos adiposos e macrófagos, avaliando a partir do cultivo com meio condicionado:

- A modulação da resposta inflamatória durante a ativação de diferentes inflamassomas, verificando;
 - a. As alterações nos níveis de citocinas;
 - b. As alterações da clivagem de caspase-1 e oligomerização de ASC
- As alterações na viabilidade celular de macrófagos;
- A modulação da resposta inflamatória induzida pela ativação de TLRs, verificando;
 - a. As alterações dos níveis de citocinas
 - b. A resposta gerada a partir da ativação de diferentes TLRs
 - c. A expressão gênica global

Investigar a função dos tecidos adiposos sobre disfunção mitocondrial de macrófagos e entender o papel dos inflamassomas nesse processo, avaliando as alterações no metabolismo bioenergético a partir do:

- a. Consumo de oxigênio
 - i. Produção de ATP
- b. Taxa de acidificação extracelular

Metodologia – capítulo II

Animais utilizados para coleta de tecidos adiposos ou células primárias

Foram utilizados camundongos fêmeas, com idade entre 8 e 13 semanas, pesando de 20 a 23 gramas (g), tanto para extração de tecidos/órgãos quanto para obtenção de células primárias. Os animais foram acondicionados em ambiente livre de patógenos, compartilhando micro isoladores ventilados, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante. Todos os experimentos dessa sessão foram realizados na *Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* (Universidade de Bonn), portanto, o cuidado com os camundongos estava em conformidade com a legislação de uso de animais para pesquisa do Estado Federal *Nordrhein-Westfalen* na Alemanha. Todos os camundongos utilizados foram da linhagem C57BL/6, com as seguintes variações:

Tabela 3-Genótipos dos camundongos utilizados

<i>Mus musculus</i> genotype	Reference
C57BL/6J	(Black; Croom; Eisen <i>et al.</i> , 1998)
<i>ASC-mCitrine Tg (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-Pycard/mCitrine*, -CD2*)Dtg/J)</i>	(Tzeng; Schattgen; Monks <i>et al.</i> , 2016)
<i>Asc^{-/-}</i>	(Sutterwala; Ogura; Szczepanik <i>et al.</i> , 2006)
<i>Il18^{-/-}</i>	(Takeda; Tsutsui; Yoshimoto <i>et al.</i> , 1998)
<i>AIM2^{-/-}</i>	(Jones; Kayagaki; Broz <i>et al.</i> , 2010)
<i>Caspase 1/11^{-/-}</i>	(Kuida; Lippke; Ku <i>et al.</i> , 1995)

Cultivo de macrófagos primários

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) - Células percussoras da medula óssea foram isoladas a partir do fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6 *wild type* ou *ASC-mCitrine Tg* e submetidas a posterior diferenciação em macrófagos com pequenas alterações do protocolo clássico desenvolvido por Warren e Vogel (Warren; Vogel, 1985).

Resumidamente, após a extração os ossos foram brevemente desinfetados com etanol 70% e a cavidade óssea onde se encontra a medula óssea lavada com meio de cultura utilizando seringa e agulha 13x4.5 mm. A suspensão celular foi filtrada (70 µM), centrifugada (400x g, 5 minutos) e então ressuspensas em meio de cultura específico para diferenciação de macrófagos; DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium- Life Technologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco), 20% de LCCM (*L-cell conditioned-medium*) e 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml -*Thermo Fisher Scientific*). Ao terceiro dia de diferenciação a cultura recebeu mais uma dose de suplementação de LCCM. Ao final de 6 dias, as células foram coletadas utilizando PBS (*Phosphate Buffered Saline – Life Technologies*) gelado suplementado com 5 mM de EDTA (*Ethylendiaminetetraacetic acid - Life Technologies*) e 2% de SFB. Após centrifugação (350 x g, 5 minutos), as células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e 'plaqueadas' de acordo com a necessidade de cada ensaio em placas 96 ou 6 poços, com 1×10^5 /poço e 3×10^6 /poço respectivamente e permanecerem na incubadora (37°C, 5% CO₂) por 24 horas, até a realização dos experimentos (Figura 21).

Macrófagos Peritoneais - Para coleta de células da cavidade peritoneal, após a eutanásia, o abdômen de cada animal foi extensivamente lavado com etanol 70%, a fim de prover maior esterilidade. Uma pequena incisão foi feita ao longo da linha média e cuidadosamente a parede peritoneal intacta foi exposta. Uma solução de 5 mL de meio de cultura gelado foi injetada através da parede peritoneal, próximo a pata traseira esquerda, e depois de 2 minutos a solução foi vagarosamente coletada de volta, evitando perfurar os órgãos da região. As células foram centrifugadas (350 x g, 5 minutos), ressuspensas em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, contadas e permanecerem na incubadora (37°C, 5% CO₂) até o dia seguinte. Momentos antes do início dos experimentos, as células em suspensão de cada poço foram descartadas, utilizando a adesão ao fundo da placa como método de seleção de macrófagos (Figura 21).

Macrófagos Humanos - Células humanas primárias foram diferenciadas a partir de monócitos isolados de bolsas de sangue resultantes de doadores saudáveis de acordo com os protocolos éticos institucionais aceitos pelo comitê da Universidade de Bonn, as bolsas foram gentilmente cedidas pelo Hospital Universitário de Bonn. Brevemente, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de centrifugação por gradiente de densidade utilizando Ficoll® Paque PLUS (700 g, 20 minutos, 50% de aceleração e sem desaceleração).

PBMCs foram então incubados com microbeads magnéticas conjugadas ao anticorpo monoclonal CD14 de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Após a marcação, monócitos CD14⁺ foram magneticamente isolados utilizando-se uma coluna MACS posicionada em campo magnético. Finalizadas as etapas anteriores, os monócitos foram plaqueados em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 1% de de penicilina/estreptomicina. Para que a diferenciação em macrófagos ocorresse, o meio foi suplementado com rhGM-CSF (500 U/mL – 55 ng/mL). As células permaneceram na incubadora por 3 dias antes da realização dos experimentos (Figura 21).

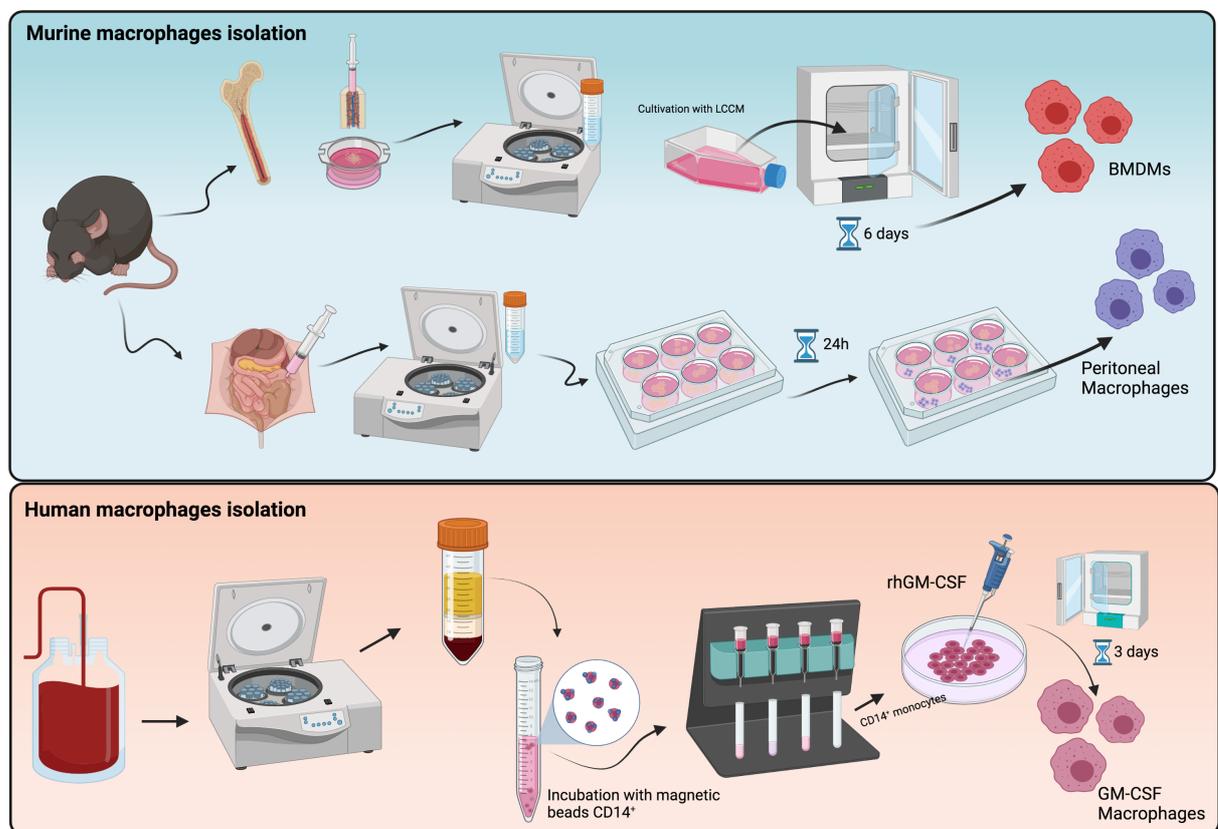


Figura 21 – Etapas de obtenção e processamento de macrófago primários

Cultivo de linhagens imortalizadas

Todos os experimentos utilizando linhagens imortalizadas foram feitos entre a 2^a ou 20^a passagem, a confluência celular durante o cultivo nunca ultrapassou 90%.

iMACs superexpressando NLRP3

A linhagem de macrófagos imortalizados superexpressando NLRP3 (*inflammassoma repórter iMacs*) foi gerada a partir de macrófagos murinos imortalizados decifientes para NLRP3 que foram reconstituídos com NLRP3-FLAG e transduzidas com ASC-mCerulean. Essa linhagem foi gerada no Instituto de Imunidade Inata e descrita anteriormente por Stutz e colaboradores (Stutz; Horvath; Monks *et al.*, 2013). O cultivo celular para expansão e manutenção foi realizado meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

THP1 – DualTM – NF-κB SEAP monócitos repoters

A linhagem comercial de monócitos humanos THP1 – DualTM foi utilizada para ensaios de ativação de NF-κB e seu cultivo foi realizado de acordo com as especificações indicadas pela fabricante Invivogen. Para cultivo inicial as células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 25 mM de HEPES, 20% de SFB e 1% 1% de penicilina/estreptomicina. Para manutenção depois da cultura inicial estabelecida a quantidade de FBS foi reduzida para 10%.

Contagem celular

Independente da origem e método de obtenção, sempre que necessário, seja para manutenção ou plaqueamento do experimento, células foram contadas manualmente utilizando-se câmara de Neubauer. Apenas células viáveis foram consideradas em todas as contagens, essas foram verificadas a partir do uso do corante Trypan Blue.

Geração de meio condicionado

Obtenção do sobrenadante - Para geração de meios condicionados, tecidos adiposos (BAT – região interescapular, WAT – gonadal) foram extraídos de camundongos *C57BL/6 wild type* (sempre fêmeas entre 8 e 12 semanas). Os tecidos foram então lavados, levemente dissociados e colocados meio de cultura por 24 horas (37°C 5% CO₂). Após esse período apenas o sobrenadante foi coletado, filtrado, centrifugado e armazenado à temperatura de -80°C para uso posterior (Figura 22).

Preparo do meio condicionado: uma parte de sobrenadante sempre era misturada com uma parte de meio de cultura fresco antes de ser iniciado o cultivo com os macrófagos. Em

ensaios específicos o meio condicionado foi submetido à altas temperaturas (37°C, 56°C e 90°C) utilizando-se um bloco térmico por 20 minutos, ou submetido a tratamento com benzonase (90U/ml).

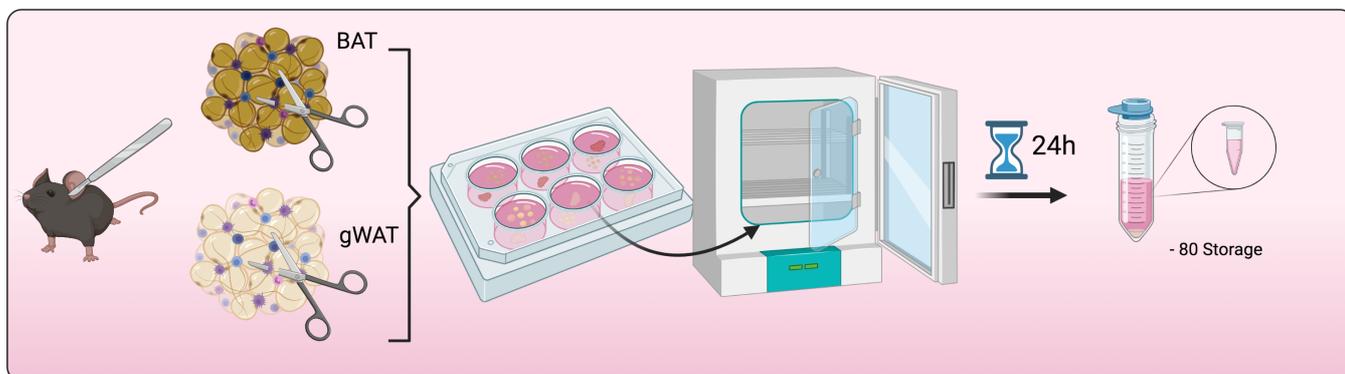


Figura 22 – Processamento para obtenção de sobrenadante de tecido adiposo.

Estímulo de TLRs e ativação dos inflamassomas

A fim de evitar interferências técnicas e maximizar a eficiência dos ensaios, a partir do momento de adição do meio condicionado e consequentes estímulos, todas as soluções eram preparadas em meio de cultura ou PBS livres de SFB. O uso de agonistas de TLRs sempre foi realizado após o pré-cultivo com meio condicionado por 1 hora, eventuais exceções estão explicitamente indicadas na legenda das figuras deste documento.

TLR4 – Lipopolissacarídeo (LPS) é um componente característico da membrana celular de bactérias gram-negativas e um potente indutor da resposta imune inata. LPS é reconhecido na superfície celular pelo complexo TLR4- MD-2, induzindo uma cascata de ativação celular que leva a ativação de NF- κ B. Foi utilizado LPS derivado de *E.coli* 0111:B4 (Sigma) na concentração de 200 ng/mL por 3 horas para ativação de TLR4 em macrófagos murinos, e 2 ng/mL para monócitos humanos.

TLR1/2 - Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4) é um lipopeptídeo (LP) sintético tri-acetilado que mimetiza a porção aminoacetilada de LPS bacterianos. A estrutura é então reconhecida por TLR2 que em interação com TLR1 levam também a ativação de NF- κ B. Foi utilizado Pam3CSK4 em macrófagos murinos por 3 horas na concentração de 1 μ g/mL e em tempos variados em monócitos humanos de linhagem.

TLR 7/8 – O composto orgânico tricíclico R848 mimetiza padrões moleculares associados a patógenos, sendo reconhecido por TLR7 e TLR8 e sendo também capaz de ativar NF- κ B. Foi utilizado R848 em macrófagos murinos por 3 horas na concentração de 1 μ g/mL. Todos os compostos utilizados para induzir o segundo sinal de ativação do inflamassomas foram adicionados as células após 3 horas de cultivos com os agonistas de TLRs, exceto para os experimentos com iMACs, já que essas não requerem a etapa de *priming* devido a super-expressão constitutiva de NLRP3.

NLRP3 – Nigericina é uma toxina microbiana derivada de *S. hygroscopicus*. Por ser um ionóforo, o atual mecanismo proposto para induzir a liberação de IL-1 β a partir da ativação de NLRP3 por essa toxina é atribuído a sua capacidade de permitir o efluxo intracelular de K⁺. Nigericina foi adicionada por 1,5 horas na cultura celular na concentração de final de 10 μ M.

AIM2 – Poly (dA:dT) sal sódico, também conhecido como poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic) sal sódico, possui DNA sintético de fita dupla (dsDNA) com sequências repetitivas de poly(dA-dT):poly(dA-dT). É um análogo sintético de B-DNA, sendo reconhecido por sensores citosólicos de DNA como o AIM-2. Para ativação desse receptor, foram preparadas soluções, em Opti-MEM, de 200 ng de poly(dA:dT) em 5 μ L e 0.5 μ L de lipofectamina TM 2000 em 5 μ L. Ambos preparos foram incubados separadamente por 5 minutos e em seguida misturados e incubados por mais 15 minutos, permitindo a formação dos complexos de transfecção. A solução final, contendo 2 μ g/mL de poly(dA:dT) e 5 μ L de lipofectamina TM foi adicionada aos macrófagos, que foram centrifugados (350 x g por 3 minutos) para acelerar o contato dos complexos de transfecção com as células, e as células foram mantidas em incubadora por 1,5 horas. Os valores aqui descritos representam o necessário para 1 poço de placa de 96 poços.

NLRC4 – Para ativação de NLRC4, macrófagos foram tratados com 100 ng/mL de LFn-BsaK - LFn (*Lethal fator N-terminal domain*) fusionado com proteína rod do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) de *B. thailandensis* – juntamente com 1 μ g/mL de antígeno protetor (PA) por 1,5 horas.

Dosagem de citocinas

Para quantificação de citocinas, por qualquer um dos métodos abaixo descritos, ao final dos ensaios específicos as células foram centrifugadas (350 x g, 5 min, temperatura ambiente)

e apenas o sobrenadante transferido para uma nova placa, onde permaneceu armazenado em -20 °C até futura utilização.

HTRF – (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence Assay®)

Para a detecção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi utilizado o kit comercial para detecção de citocinas murinas por HTRF (Cisbio). A técnica consiste em aplicar a detecção de fluorescência por FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) dentro de um ensaio sanduíche. Dois anticorpos para a citocina de interesse são utilizados, onde um está acoplado ao doador (Cryptate) e outro com o acceptor (XL). Se os dois anticorpos reconhecem o analito, o doador emite um sinal fluorescente a partir de um estímulo excitatório e a energia é transferida para o acceptor mais próximo, dando a esse um sinal fluorescente. A emissão de doador e acceptor é calculada e a razão das duas fluorescências é então calculada. De acordo com as instruções do fabricante, 12 μ L de sobrenadante celular previamente diluído foi misturado com 1,5 μ L de cada um dos anticorpos em micro-placa branca de fundo chato de 384 poços. Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas ou 4 °C por 16 horas, os sinais fluorescentes de doador e acceptor foram mensurados em 620 nm e 688 nm, respectivamente, no *SpectraMax i3 Multi-Model Platform Microplate* (Molecular Devices). Os dados foram analisados através do programa SoftMaxPro, com a concentração de citocinas sendo gerada a partir de interpolação com a curva padrão, e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (ng/mL).

ELISA

A quantificação de IL-10 no sobrenadante de BMDMs foi feita seguindo o mesmo protocolo apresentado na seção *Materiais e Métodos – Parte I* desse trabalho, com diferenças ínfimas, sendo relevante apenas comentar que o aparelho utilizado para medir a absorvância nesse caso foi o *SpectraMax i3 Multi-Model Platform Microplate* (Molecular Devices).

Multiplex Cytokine Beads assay

Para a detecção simultânea de IL-1 α e IL-18, foram utilizados anticorpos biotinizados acoplados a *beads* magnéticas em um protocolo que combina princípios de ELISA sanduíche com *microarray* de citocinas. As *beads* foram diluídas em PBS, preparadas em uma concentração de 500 *beads*/citocina/poço e posicionadas sobre um ímã por 5 minutos. Após remoção do veículo, amostras e curva-padrão foram adicionadas e a placa incubada à temperatura de 4° C por 16 horas. No dia seguinte, a placa foi novamente posicionada em ímã por 5 minutos antes das etapas de lavagem. Em seguida, as *beads* foram incubadas com

anticorpos de detecção por 1 hora à temperatura ambiente sob constante agitação. Após novas etapas de lavagem e incubação com Streptavidin-PE (diluição 1:333), as *beads* foram diluídas em tampão próprio e utilizadas para o ensaio no aparelho MagPix (Merck). Os resultados são expressos em fluorescência normalizada e o programa Millipore Milliplex Analyst v. 2.0 foi utilizado para análise.

Quantificação da liberação LDH

Terminada a incubação com nigericina, as células foram centrifugadas (350 xg, 5 min, RT) e apenas o sobrenadante fresco foi transferido para uma nova placa e imediatamente submetido à quantificação de LDH, já que a eficiência do ensaio é altamente superior se realizado antes de qualquer etapa de congelamento. A concentração de LDH é mensurada de forma indireta, baseando-se no fato de que a enzima catalisa a conversão de lactato a piruvato, levando à redução de NAD⁺ em NADH. A enzima diaphorase utiliza-se então de NADH para reduzir sal de tetrazólio em cristais de formazan vermelhos, e esse é então mensurado em 490 nm pelo aparelho Spectramax i3. Os níveis de formação de formazan são diretamente proporcionais à quantidade de LDH liberada no sobrenadante. Utilizando-se do kit CyQUANT™ LDH cytotoxicity assay de acordo com as especificações do fabricante, 12,5 µL de sobrenadante foram misturados com 12,5 µL do substrato da reação (fornecido pelo kit) em placa de 384 poços de fundo chato, transparente, não tratada, e incubados por 30 minutos a 37°C protegidos da luz. Depois de aferida a absorbância, porcentagens de liberação de LDH foram calculadas a partir da normalização de dos valores obtidos em cada poço com os valores obtidos em células tratadas com tampão de lise (100% de liberação).

$$\%LDH = 100 - \frac{[(\overline{\text{Controle Positivo}}) - \text{Amostra}]. 100}{(\overline{\text{Controle positivo}} - \overline{\text{Controle não estimulado}})}$$

Análise de viabilidade celular através de avaliação da capacidade redutor

Terminada a incubação com ativadores do inflamassoma, as células foram centrifugadas (350 x g, 5 min, temperatura ambiente), o sobrenadante foi recolhido e os macrófagos aderidos na placa foram incubados com 50 µL do reagente CellTiter-Blue® (CTB) para análise de viabilidade celular. Importante observar que o reagente CTB precisa estar a 37°C antes de ser

adicionado às células, para garantir que a diferença de temperatura entre o meio de cultura anterior não influencie na viabilidade. O ensaio fluoreométrico utiliza a capacidade metabólica da célula como um indicador de viabilidade, avaliando a redução de rezaurina em resofurina, sendo a última fluorescente. Após adição do composto as células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ e ao final do tempo pré-estabelecido o sinal fluorescente foi medido pelo aparelho Spectramax i3 em 590 nm. Como controle positivo de perda de capacidade redutiva, células foram lisadas com 0,5 % de triton, e a porcentagem de viabilidade foi calculada considerando a média entre o controle positivo e células não estimuladas.

$$CTB (\%) = \left[\frac{(amostra - \overline{controle\ positivo})}{\overline{controle\ não\ estimulado} - \overline{controle\ positivo}} \cdot 100 \right]$$

Analizador Automático de Western Blot - WES™

Para visualização de caspase-1 clivada, o sobrenadante celular foi depositado em capilares do sistema *Simple Western Size Assay – WES module* de acordo com as instruções do fabricante. Amostras foram diluídas em Master Mix contendo DTT e uma mistura de *standarts* fluorescentes, e em seguidas submetidas à desnaturação a 95 °C. As amostras, juntamente com: um marcador biotiniliado; anticorpo primário; anticorpo secundário conjugado com HRP; substrato quimioluminescente e tampão de lavagem foram incorporadas em uma micro-placa apropriada. Uma vez que a placa é posicionada dentro do sistema, todas as etapas seguintes do processo ocorreram de forma automatizada. Proteínas são separadas por eletroforese capilar, a detecção por anticorpos é semelhante ao que acontece em um Western Blot convencional. Resultados foram analisados com o software *Compass for Simple Western*.

Ensaio de Atividade de Caspase

A fim de determinar a atividade de caspase-1, foi utilizado o kit comercial *Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay* (Promega). O ensaio é baseado em bioluminescência onde a caspase-1 presente no sobrenadante cliva o substrato Z-WEHD-aminoluciferin, ocorrendo a liberação do substrato para luciferase (aminoluciferin), permitindo assim a atividade da luciferase em si. Essa reação permite a geração de um sinal luminoso que é mensurado e correlacionado com a

atividade de caspase-1. De forma simplificada; o tampão Caspase-Glo é misturado com o substrato Z-WEHD e adicionado, na mesma proporção, ao sobrenadante fresco após a incubação com nigericina. A placa deve ser incubada então em temperatura ambiente protegida da luz até que o sinal luminescente possa ser aferido, após 1 hora, no leitor de placas SpectraMax® i3.

Western Blotting

Um total de 3×10^6 BMDMs foram adicionados em placas de 6 poços e após diferentes condições experimentais foi avaliada a presença de diferentes proteínas presentes no lisado celular. Os diferentes estímulos e tempos estão especificados nas legendas, entretanto os procedimentos de lise celular, quantificação proteica, eletroforese, transferência para membrana de PVDF e marcação com anticorpos seguiu o mesmo protocolo.

Extração de proteínas

Ao final de cada experimento as células foram centrifugadas (350 x g, 5 minutos), e o sobrenadante recolhido. Os macrófagos aderidos na placa seguiram incubados com 10 μ L de tampão RIPA (*radioimmunoprecipitation*) suplementado com inibidor de protease livre de EDTA (*cOmplete™ EDTA-free protease inhibitors*) e inibidor de fosfatase (PhosSTOP™), por 20 minutos, sobre o gelo e com sucessivas pipetagens para auxiliar o processo de lise. Os lisados foram então centrifugados por 10 minutos em alta velocidade, 3000 x g, a 4°C, a fim de descartar contaminações com DNA. O sobrenadante, contendo as proteínas, foi então armazenado em -80°C para uso posterior.

Quantificação e preparação de amostras

Afim de garantir que a mesma quantidade de proteínas por amostra seria submetida a eletroforese, um ensaio de ácido bicinonínico (BCA) foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. A absorbância foi mensurada em 562 nm e a concentração por amostra determinada a partir de interpolação com uma curva padrão baseada em concentrações de albumina sérica. As amostras foram então diluídas novamente em tampão RIPA afim de se obter uma quantidade homogênea, entre 10 e 30 μ g, além da adição do agente redutor NuPAGE e o tampão LDS (*Lithium dodecyl sulfate*) NuPAGE.

Eletroforese SDS (dodecil sulfato de sódio)-PAGE

Amostras diluídas em tampão LDS com agente redutor foram sempre incubadas em 90°C por 10 minutos antes de serem adicionadas em um 4-12% NuPAGE Bis-Tris. Para cada gel, um marcador de tamanho molecular (PageRuler Plus, pre-strained) foi adicionado em um dos poços. O processo de eletroforese redutora ocorria utilizando-se tampão MES, 150 V entre 65 e 90 minutos.

Transferência proteica para membrana PVDF (Immobilon-FL polyvinylidene difluoride)

Após a separação, proteínas eram transferidas para membrana de PVDF com a utilização de um sistema molhado (XCell II™ Blot Module). Afim de facilitar o processo, as membranas eram banhadas em metanol 100% para contornar sua natureza hidrofóbica. As condições de transferência foram: 32V, 65 minutos.

Marcação com anticorpos e aquisição de imagens

Ligações inespecíficas de anticorpos foram evitadas incubando-se a membrana em tampão de bloqueio por pelo menos 2 horas em temperatura ambiente. Anticorpos foram diluídos nesse mesmo tampão e incubados por 18 horas à 4°C (anticorpo primário) ou 2 horas em temperatura ambiente. Um ciclo de lavagens ocorreu após incubação com cada um dos anticorpos utilizando-se TBS-Tween. Após a última lavagem, as membranas foram mantidas em TBS, e a reatividade dos anticorpos foi detectada a partir de mensuração de sinal fluorescente infra-vermelho utilizando-se do aparelho Odyssey Imager (Li-Cor Biosciences).

Atividade de NF-κB utilizando sistema QUANTI-Blue™

A linhagem celular THP-1 Dual™ (Invitrogen) expressa um gene repórter fosfatase alcanina embrionária secretada (SEAP) direcionada por um promotor mínimo fusionado a cinco cópias de elementos de resposta de transcrição de NF-κB. Sendo assim, a utilização dessa linhagem permitiu o estudo da ativação de NF-κB, monitorando a atividade de SEAP e quantificando a mesma utilizando o reagente QUANTI-Blue™. O método consiste em um ensaio enzimático colorimétrico, onde o reagente QUANTI-Blue é capaz de detectar a presença de qualquer fosfatase alcalina no sobrenadante celular, induzindo uma mudança de coloração de rosa para roxo. Seguindo as recomendações do fabricante, a ativação de NF-κB foi feita estimulando-se TLR1/2 com Pam3CSK4 por 24 horas, então uma solução de QUANTI-Blue

foi adicionada e as células voltaram para incubação à 37 °C. A densidade óptica foi medida em 620-655nm em diferentes intervalos de tempo por 6 horas.

Vizualização e quantificação de ASC specks

Terminada a incubação com nigericina, *BMDMs – ASC-mCitrine* ou *iMACs – ASC-mCerulean*, foram fixados em PBS contendo 4% methanol-free formaldehyde por 20 minutos em temperatura ambiente. A sonda nuclear DRAQ5, diluída em PBS, foi utilizada na concentração final de 5 mM. O marcador de membrana nuclear wheat germ agglutinin (WGA)–Alexa Fluor 555 (Invitrogen) na concentração 5 µg/ml foi utilizado para aquisição de imagens representativas de BMDMs. Todos os ensaios de imagem foram realizados em placa de cultivo celular de 96 poços, preta e de fundo chato. Células fixadas, mantidas a 4°C, foram analisadas sempre não mais que uma semana após a realização do experimento.

Microscopia de Fluorescência Confocal

Imagens representativas da formação de ASC specks em BMDMs foram adquiridas utilizando o microscópio *Leica True Confocal Scanner SP5 Single Molecule Detection* (Leica Microsystems). Os seguintes lasers foram utilizados para identificação dos sinais fluorescentes: mCitrine, laser argônio (514 nm); WGA-Alexa Fluor 555, laser argônio (55 nm) e DRAQ5, Hélio/Neônio laser (633 nm) (Figura 23). O microscópio foi operado utilizando o software LAS AF 2.7.3 (Leica). Imagens foram adquiridas utilizando uma objetiva *63x HCX PL APO*, com abertura numérica 1.2, resolução 1024x1024 e analisadas com o software *Velocity 6.01* (PerkinElmer).

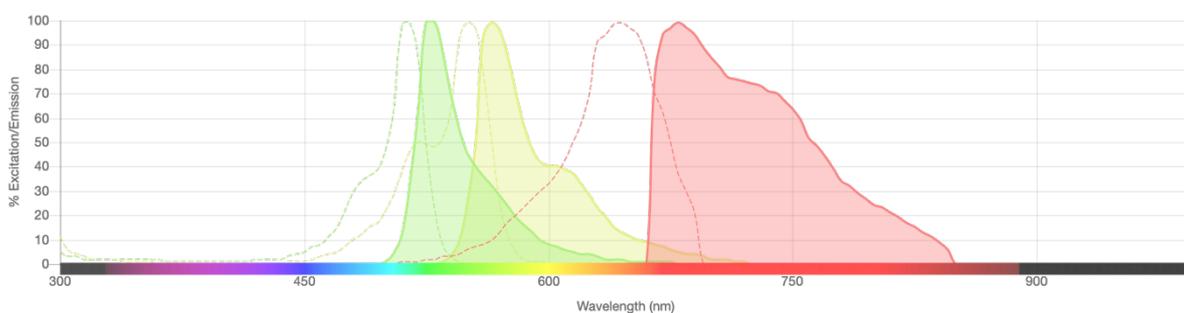


Figura 23 – Picos de emissão e excitação de fluoróforos utilizados para microscopia de fluorescência *confocal*

Microscopia de Fluorescência em Largo Campo

Para quantificação automatizada de ASC specks em BMDMs e iMACs imagens foram geradas nas instalações da Microscopy Core Facility (Hospital Universitário, Universidade de Bonn) utilizando o microscópio de fluorescência Observer.Z1 (Zeiss) com objetiva *20x LD Plan Neo Fluor*, abertura numérica 0.4. O microscópio foi operado utilizando o software Zen 2.3 Pro (Zeiss). As seguintes configurações de filtros foram aplicadas: mCitrine, filtro Zeiss #46 HE (YFP); mCerulean, filtro Zeiss set #47 HE (CFP) e DRAQ5, filtro Zeiss #50 (Cy5). Para todos os experimentos um total de 6 imagens por poço foram adquiridas, para automatização do foco o canal DRAQ5 foi escolhido. Imagens foram exportadas em dois formatos, TIFF para uso direto, ou *raw image data* para quantificação de estruturas.

Quantificação automatizada de ASC Specks

Imagens adquiridas no microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 foram importadas em formato bruto no software Cell Profile 3.19 e analisadas utilizando a pipeline gerada e gentilmente cedida pelo Dr. Gabor Horvath (Microscopy Core Facility - Hospital Universitário de Bonn), que se baseia em converter sinais de imagens fluorescente em binários. Brevemente, após extração dos sinais fluorescente, uma correção de iluminação foi calculada e aplicada para cada canal separadamente. Em imagens já corrigidas os objetos primários, núcleos e ASC specks, foram identificados e contados. Diâmetros entre 10-80 pixels e 2-9 pixels foram utilizados para identificação dos núcleos e specks respectivamente (esse parâmetro poderia ser ajustado entre os sets de imagens). Objetos fora dos diâmetros determinados eram descartados. Para aumentar a acurácia de identificação de specks a ferramenta *Enhance Feature* foi aplicada. Após realizar a contagem nuclear e de ASC specks, o software gera um “*reporter file*” contendo o número de cada uma das estruturas para cada imagem. Com esses valores, a razão speck/núcleo de cada poço foi calculada.

Análise de expressão gênica por PCR quantitativa

Apesar dessa etapa ter sido descrita na seção Materiais e Métodos Parte I, ao contrário da dosagem de citocinas por ELISA, optamos por incluir novamente maiores detalhes da metodologia. Nesse experimento, a diferença entre laboratórios levou a maiores variações nos protocolos utilizados. Todos os experimentos dessa seção foram realizados com BMDMs estimulados em placas de 6 poços em densidade celular de 3×10^6 células por poço.

Extração de RNA

Após serem lavados com PBS uma vez, macrófagos foram submetidos a extração de RNA com o RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN). Seguindo as recomendações do fabricante, 350 µL de tampão RLT suplementado com 1% (v/v) β-mercaptoethanol foram utilizados para lise celular. Contaminantes de DNA foram digeridos através de incubação com endonuclease DNase I por 15 minutos em temperatura ambiente. O RNA foi então eluído em 30 µL de H₂O ultra pura livre de nuclease. A concentração de RNA foi averiguada medindo sua absorvância em 260 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFisher). O RNA foi considerado puro de contaminantes proteicos ou solventes orgânicos quando as razões dos valores de absorvância $A_{260/280}$ ou $A_{260/230}$, respectivamente, eram superiores a 2.

Síntese de cDNA

O mRNA previamente isolado foi transcrito em cDNA usando iniciadores (primers) que se ligam à cauda poli(A) do mRNA e uma transcriptase reversa. Para cada amostra, 1 µg de RNA foi trazido a um volume de 12,9 µL em água livre de nuclease. 1 µL de oligo (dT) 18 primer foi adicionado ao RNA e a mescla foi incubada a 65 °C por 5 minutos para desnaturar a estrutura secundária do mRNA. As amostras foram então resfriadas em gelo por 1 minuto a fim de permitir o emparelhamento do primer com o mRNA. Sequencialmente, 4 µL de *first-strand buffer 5x*, 1 µL de 10 mM dNTPs, 1 µL de *ditiotreitól* 0,1 M (DTT) e 0,1 µL da transcriptase reversa *SuperScript III* foram adicionados à mistura. Além disso, um controle com RNA de todas as amostras, mas que não continha a transcriptase reversa, foi preparado. Amostras foram incubadas por 50 minutos em 50 °C para permitir a transcrição reversa e subsequentemente aquecido até 85 °C durante 5 minutos para desnaturar a transcriptase. O cDNA foi diluído 1:10 pela adição de 180 µL de água livre de nuclease e usado imediatamente para qPCR ou armazenado a -20 °C para uso posterior.

PCR quantitativa

qPCR foi realizada em placa de 384 poços usando o corante fluorescente de ligação ao DNA SYBR Green no sistema QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR. 2 µL de cDNA pré-diluído foram misturados com 5 µL de SYBR[®] Green, 2 µM de ambos os primers (Tabela 4) e água livre de nuclease. Amostras foram adicionadas em triplicatas e submetidas a um programa de 40 ciclos em que cada ciclo consistia em duas etapas: uma etapa de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e uma etapa de anelamento/extensão em 60 °C por 60 segundos. Os resultados foram obtidos utilizando-se os valores do ciclo limitante (C_T , *threshold cycle*) para o cálculo de

$2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizados pela expressão relativa de mRNA do gene de expressão constitutiva *Actb* (β -actin). Os valores finais foram apresentados em variação numérica linear em relação à mesma.

Tabela 4- Sequência de Iniciadores para qPCR

HUGO Gene ID	UniProt Proteína ID	Sequência de Iniciadores - Primers		Fragmento (pb)
		Senso/Forward	Antisseno/Reverse	
Tnf	Tumor necrosis factor	5'-CCAAATGGCCTCCTCTCAT -3'	5'-TGGTGGTTTGTCTACGACGTG -3'	107
Nlrp3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	5'- TGGGGTTGGTGAATTCCGGC -3'	5'-AGCCTGAGTCCTGTGTCTCCA -3'	127
Il1b	Interleukin-1 beta	5'-TTGACGGACCCCAAAAGATG -3'	5'- CAGCTTCTCCACAGCCACAA -3'	146
Nos2	Nitric oxide synthase	5'- GCCACCAACAATGGCAACA -3'	5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAATT -3'	103
Arg1	Arginase-1	5'-CAGTCTGGCAGTTGGAAGCA -3'	5'- ACAGGTTGCCCATGCAGATT -3'	132
Mrc1	Macrophage mannose receptor 1	5'- TGATTGGTGGCAATTCACGA -3'	5'- ACAGGCAGGGAAGGGTCAGT -3'	103
Il10	Interleukin-10	5'- GAAGCATGGCCCAGAAATCA -3'	5'-TCACAGGGGAGAAATCGATGA -3'	102
Actb	Actin	5'-TCCACCTTCCAGCAGATGTG-3'	5'- CTGGTGAAAAGGACCTCTCG -3'	75

Sequenciamento de mRNA

Extração e controle de qualidade

BMDMs cultivados com CM BAT e CM WAT por 1 hora com adição consecutiva de LPS por mais 1 hora foram submetidos a extração de RNA com o RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) como descrito anteriormente. O controle de qualidade das amostras (tamanho, quantidade e integridade) foi realizado com o sistema TapeStation (Agilent) através do método de eletroforese automatizada (Figura 24).

Preparação da biblioteca e sequenciamento

A preparação da biblioteca e o sequenciamento do RNA foram realizados por André Heimbach e colaboradores da instalação central de NGS do Hospital Universitário de Bonn (Institute of Human Genetics, University Hospital Bonn). A geração da biblioteca foi conduzida de acordo com as diretrizes do fabricante com uma entrada de 100 ng de RNA total usando Quant™ Seq's 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD para Illumina (Lexogen). Em suma, a transcrição reversa foi realizada com oligo dT priming (primeira fita) e iniciação aleatória (segunda fita). Após uma etapa de purificação com base em esferas magnéticas, as bibliotecas foram amplificadas usando 15 ciclos de PCR. As bibliotecas foram sequenciadas em um HiSeq

2500 usando HiSeq v4 com um comprimento de leitura de 1 x 50 pares de bases. Mais de 20 milhões de leituras brutas foram geradas por amostra.

Processamento de dados e análise estatística

A análise do conjunto de dados de sequenciamento de RNA foi realizada pela Dra. Susanne V. Schmidt (Instituto de Imunidade Inata, Hospital Universitário de Bonn). Os arquivos fastq brutos foram alinhados contra o genoma murino usando STAR v2.5.3a com opções padrão modificadas usando BySJout para filtragem, 20 como mapeamento de leitura máxima, permitindo 999 como incompatibilidades máximas e 0,6 como proporção mapeada de incompatibilidade no PartekFlow. A quantificação da transcrição em nível de gene foi realizado em PartekFlow com o algoritmo E / M contra o hg19 RefSeq Transcript. Isso resultou em uma tabela de contagem de leitura contendo 13.641 genes, que foi exportada para normalização usando DESeq2 no R v3.5. Contagens de leitura <1 foram reduzidas a 1. Para identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) realizou-se ANOVA entre diferentes grupos de teste considerando alterações de expressão de pelo menos duas vezes e filtrando por taxa de descoberta falsa (FDR) no software PartekGenomic Suits. Análise de ontologia genética foi realizada para DEGs em comparações específicas através de *GO Enrichment* restringindo a análise a grupos funcionais com mais de 3 genes e aplicando Teste Exato de Fisher.

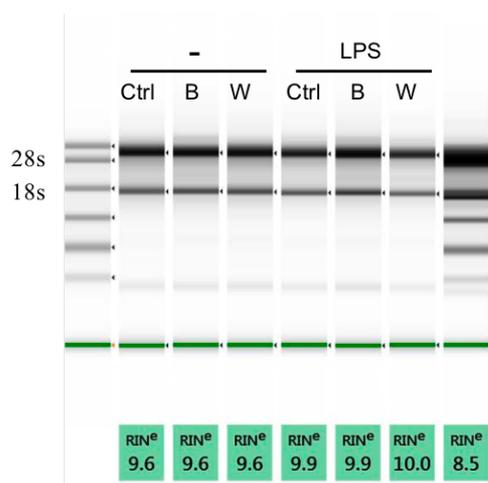


Figura 24 – Eletroforese automatizada para controle de qualidade de um dos experimentos independentes que foram submetidos a análise de sequenciamento de nova geração.

Análise de Fluxo Extracelular

A taxa de consumo de oxigênio (OCR – *oxygen consumption rate*) e acidificação do meio extracelular (ECAR- *extracellular acidification rate*) foi verificada em cenários variados de desenhos experimentais utilizando a tecnologia Seahorse XF seguindo as recomendações do fabricante (Agilent).

Plaqueamento celular e hidratação do cartucho

Essa etapa foi realizada no dia anterior ao ensaio *per se*. BMDMs foram plaqueados utilizando meio padrão de cultivo em placa de 96 poços específica para o ensaio, deixando inutilizados os poços das extremidades (A1/A12/H1/H12). O cartucho (acoplado à placa de calibração) foi hidratado com solução XF de calibração e mantido overnight a 37°C na ausência de CO₂.

Preparação dos macrófagos

Ao final do tempo de estímulo, RPMI (não tamponado) foi utilizado para etapas de lavagem e substituição do meio de cultivo dos macrófagos. As células foram então incubadas por 1 hora em 37°C na ausência de CO₂.

Preparação do cartucho e medição em tempo real

O ensaio baseia-se na avaliação em tempo real da resposta celular a estímulos que induzem estresse metabólico (Tabela 5). Utilizando-se de uma sonda capaz de permanecer apenas 200 microns acima da monocamada celular, é possível verificar com apenas 2 µL, e sem qualquer perturbação extra ao meio, o fluxo de oxigênio, assim como a liberação de prótons H⁺ no meio extracelular. Os compostos necessários, abaixo descritos, são pré-adicionados em cada um dos reservatórios apropriados do cartucho adicionados ao meio através de injeções pneumáticas seguindo um padrão de intervalos entre as injeções e aferições pré-determinado.

Tabela 5 – Compostos utilizados em ensaio de análise de fluxo extracelular

Composto	Concentração	Função
Glicose	10 mM	Substrato para glicólise
Oligomicina	1 µM	Inibidor do complexo V da CTE
FCCP (fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone)	2 µM	Agente desacoplador
Rotenona / Antimicina A	0,5 µM (ambos)	Inibidores dos complexos I e III da CTE

Análise

O aparelho utilizado foi o *Seahorse Bioscience 96-well XF extracellular flux analyzer* (Agilent) que possui software próprio para geração e exportação dos dados, *Agilent Seahorse Wave Desktop Software*. Foram utilizados também três geradores automáticos de relatórios indicados pela empresa: XF Cell Mito Stress Test, XF Energy Phenotype, XF Glycolysis Stress Test (Figura 25).

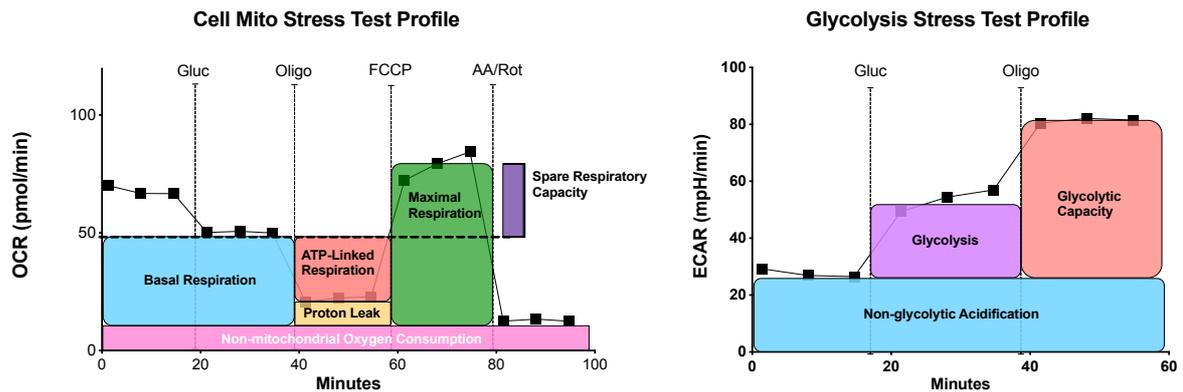


Figura 25 – Padrão de perfis cinéticos gerados a partir de análise de fluxo extracelular. Ilustração criada pela autora

Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média com erro padrão da média (*SEM – standart error of the mean*) ou desvio padrão (*SD – standart deviation*) como indicado em cada legenda. Os testes D'Agostino-Pearson ou Anderson-Darling foram utilizados para análise de resíduos afim de verificar se os dados possuíam distribuição Gaussiana. Por fim, foi executado o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste de Tukey, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0.05$. Toda a análise estatística e elaboração dos gráficos foi realizada no software Graphpad Prism.

Resultados – capítulo II

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT diminui a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos

Alterações na resposta inflamatória de macrófagos são utilizadas como *hallmarks* em estudos que buscam melhor compreender o funcionamento do imunometabolismo. Com intuito de verificar o efeito do tratamento de meio condicionado na resposta inflamatória de macrófagos, inicialmente foi avaliada qual seria a resposta dessas células a partir da ativação clássica do inflamassoma NLRP3. Para isso, BMDMs diferenciados por 6 dias na presença de LCCM (*L cell conditioned medium*), foram cultivados na presença de CM BAT ou CM WAT em proporção 1:1 com seu meio de manutenção regular, por 1 hora. Em seguida, a ativação de TLR-4 foi feita a partir da adição de LPS à cultura celular por 3 horas, ocorrendo assim o primeiro passo, *priming*, para ativação do inflamassoma. O segundo sinal de ativação do inflamassoma foi induzido a partir da adição de nigericina à cultura, a qual atua como um ionoforo, promovendo o efluxo de potássio e influxo de H⁺. Ao término de 1,5 horas na presença de nigericina, o sobrenadante livre de células foi coletado para análises subsequentes, e as células foram lisadas ou mantidas íntegras a depender da análise a ser realizada.

Como previamente mencionado nesse trabalho, a liberação de IL-1 β e IL-18 são sinais clássicos de ativação do inflamassoma (Martinon; Burns; Tschopp, 2002), sendo, portanto, o ponto de partida de avaliação, juntamente com IL-1 α (Figura 26). A adição de CM BAT ou CM WAT não induziu a liberação de IL-1 β ou IL-1 α , nem quando adicionados isoladamente na cultura, nem na presença de LPS. O que foi observado foi a diminuição da secreção causada em células que tiveram a secreção estimulada pela presença de nigericina. O efeito aconteceu independente do tecido gerador do meio condicionado, entretanto, o fenótipo é mais forte na presença de CM BAT ao se avaliar os níveis de IL-1 β . Importante observar que não foram encontrados níveis significativos de nenhuma das duas citocinas no meio condicionado puro de nenhum dos dois tecidos. Por outro lado, para IL-18, foram encontrados níveis altos da citocina apenas na presença de CM BAT e CM WAT, sem nenhum tratamento adicional com LPS ou nigericina, mas esses níveis podem ser explicados pela identificação de IL-18 no meio condicionado puro dos dois tecidos.

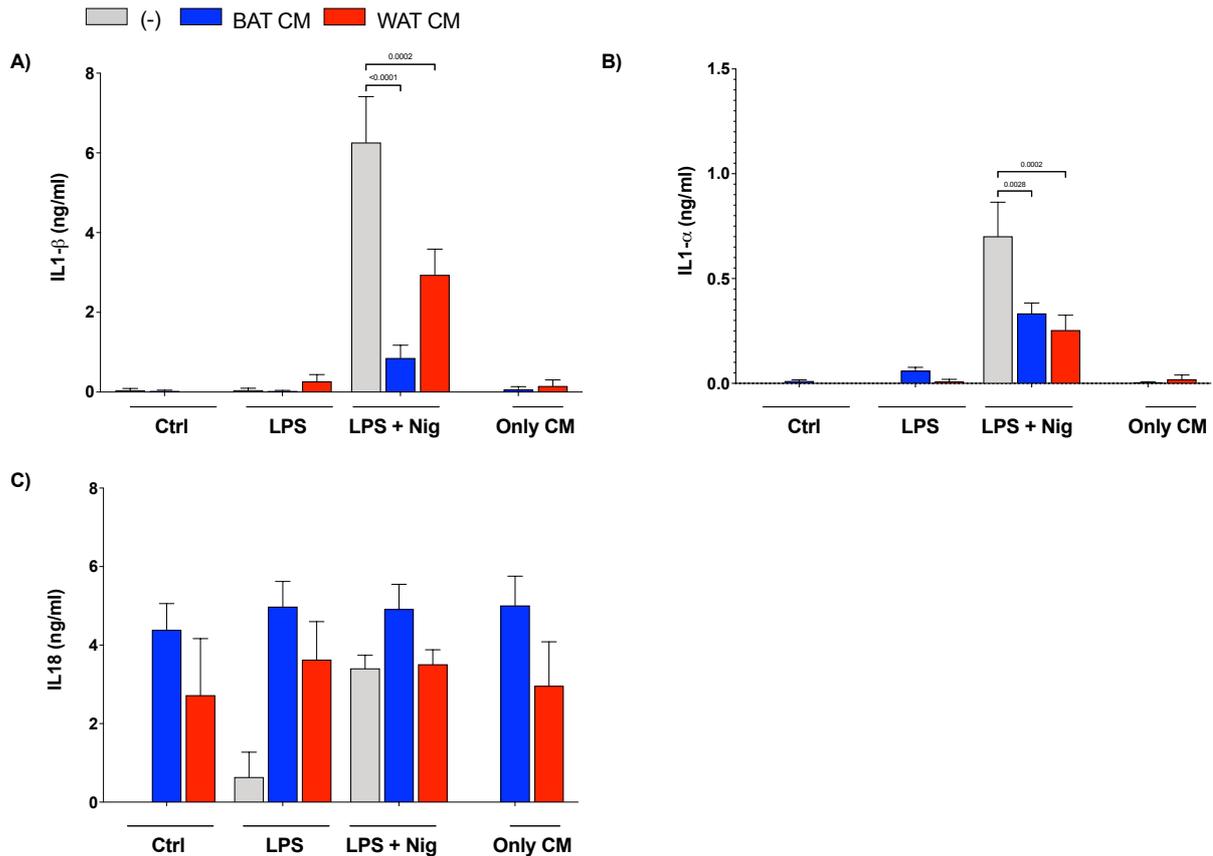


Figura 26 - **Quantificação de IL-1 β (A), IL-1 α (B) e IL-18 por HTRF.** Sobrenadante livre de células, proveniente após centrifugação, coletado a partir de BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Quantificação de cada citocina também foi realizada em uma alíquota de meio condicionado puro, previamente separada antes do cultivo com macrófagos ser iniciado. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detectação do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Assim como IL-1 β , a liberação de LDH no meio extracelular também é um conhecido *hallmark* da ativação do inflamassoma a partir de uma grande variedade de já bem estabelecidos indutores de ativação de NLRP3. Assim como observado para os níveis de IL-18, não foi possível concluir como a adição de CM BAT ou CM WAT influenciou a liberação de LDH em macrófagos pois já encontramos altos níveis presentes no próprio meio condicionado (Figura 27A). Com a clara diminuição de IL-1 β gerada pela adição de CM BAT e CM WAT, o próximo passo foi a avaliação da ativação de caspase-1. Observamos através da análise da subunidade p-20 liberada no sobrenadante, que indica a ativação de caspase-1 que a adição de meio condicionado diminui a clivagem da proteína (Figura 27B). Esse resultado também foi confirmado em ensaio de bioluminescência específico para avaliação de clivagem de caspase-1 (Figura 27C).

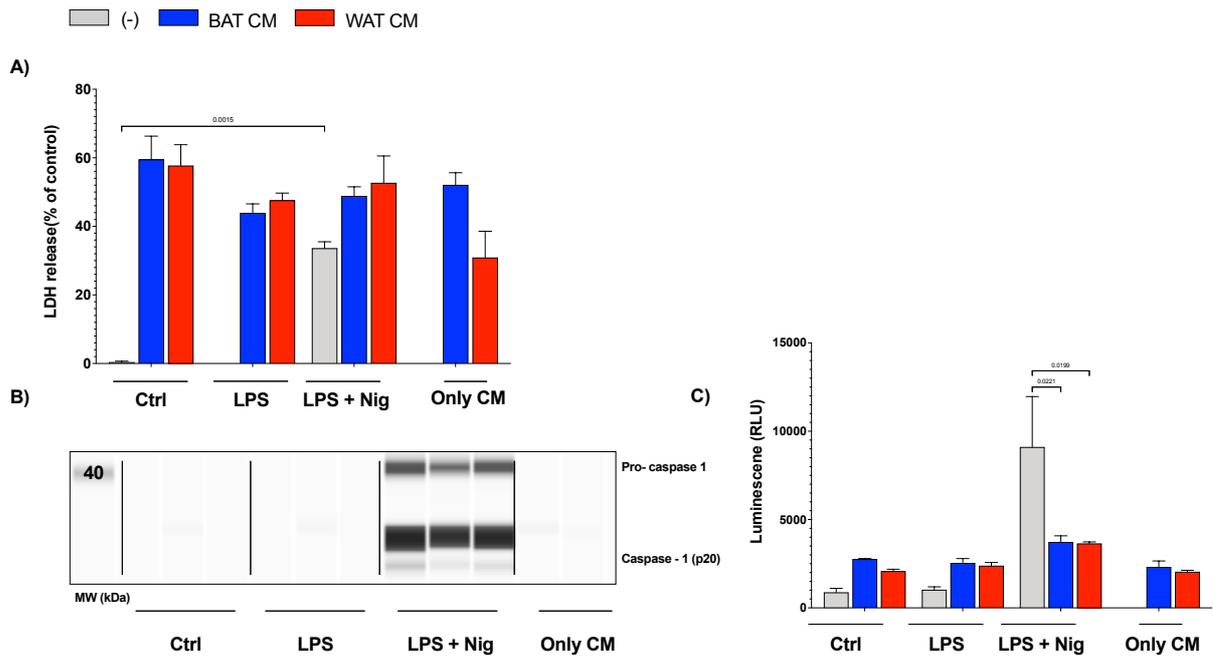
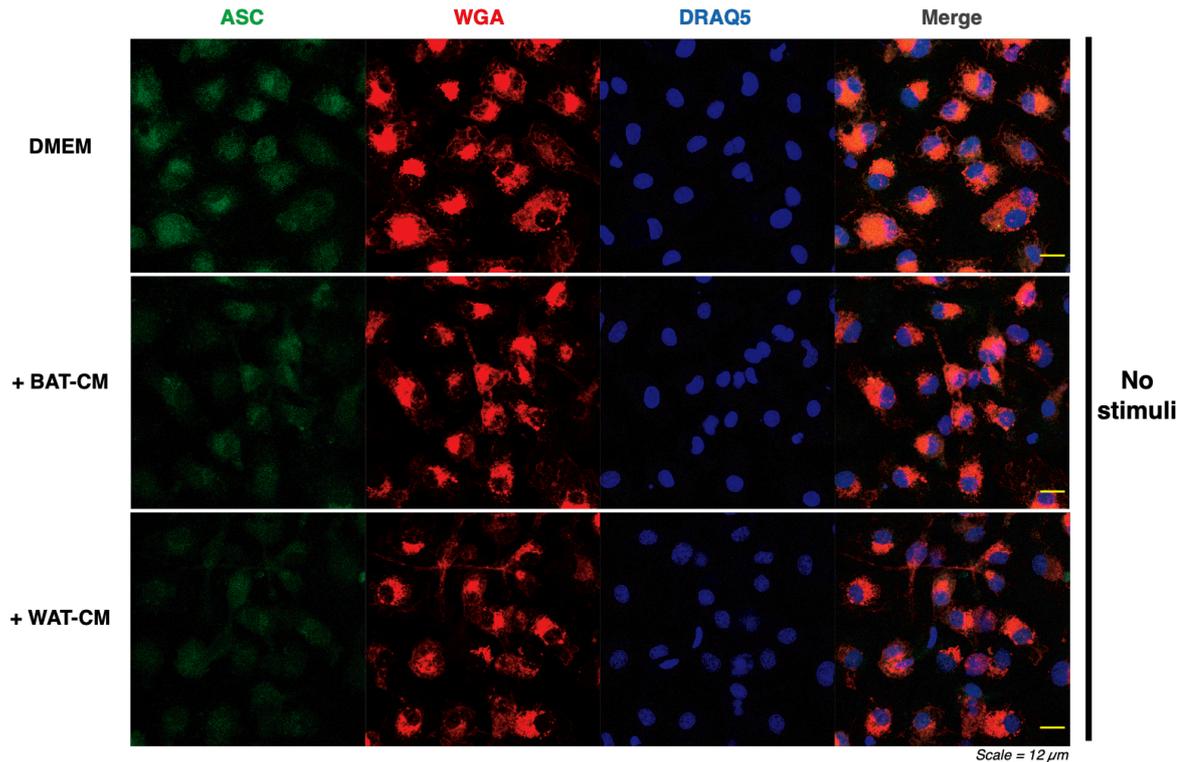
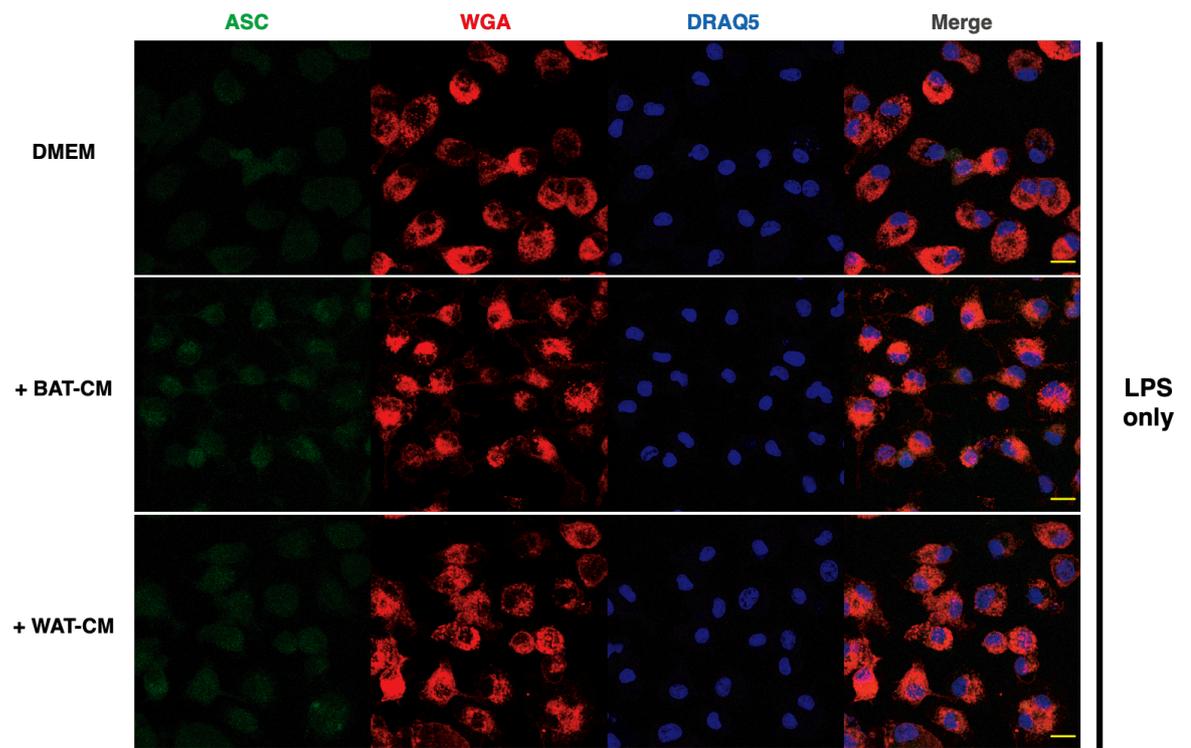


Figura 27 - **Liberação de LDH e atividade de caspase-1.** Sobrenadante livre de células, proveniente após centrifugação, coletado a partir de BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Cada ensaio também foi realizado em uma alíquota de meio condicionado puro, previamente separada antes do cultivo com macrófagos ser iniciado. Liberação de LDH quantificada em porcentagem a partir de comparação com controle positivo interno (A). Capillary Western Immunnoassay para identificação de caspase-1 clivada (B). Atividade de caspase-1 quantificada com uso de reagente específico de mensuração de atividade a partir de fluorescência (C). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média (A) ou desvio padrão (C). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações (A).

Ainda dentro da cascata de ativação do inflamassoma NLRP3, seguindo o que estaria “*up-stream*” à clivagem de caspase-1, nessa etapa se priorizou analisar se a adição de meio condicionado também geraria algum efeito na oligomerização de ASC, através da observação de ASC *specks*. Avaliando as imagens geradas por microscopia confocal, assim como a quantificação, fica claro que CM BAT e CM WAT também previnem a oligomerização de ASC em macrófagos causada pela ativação de NLRP3 por nigericina (Figura 28).



Scale = 12 μ m



Scale = 12 μ m

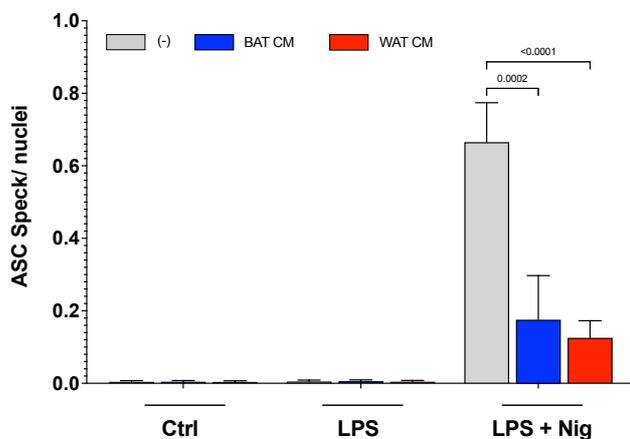
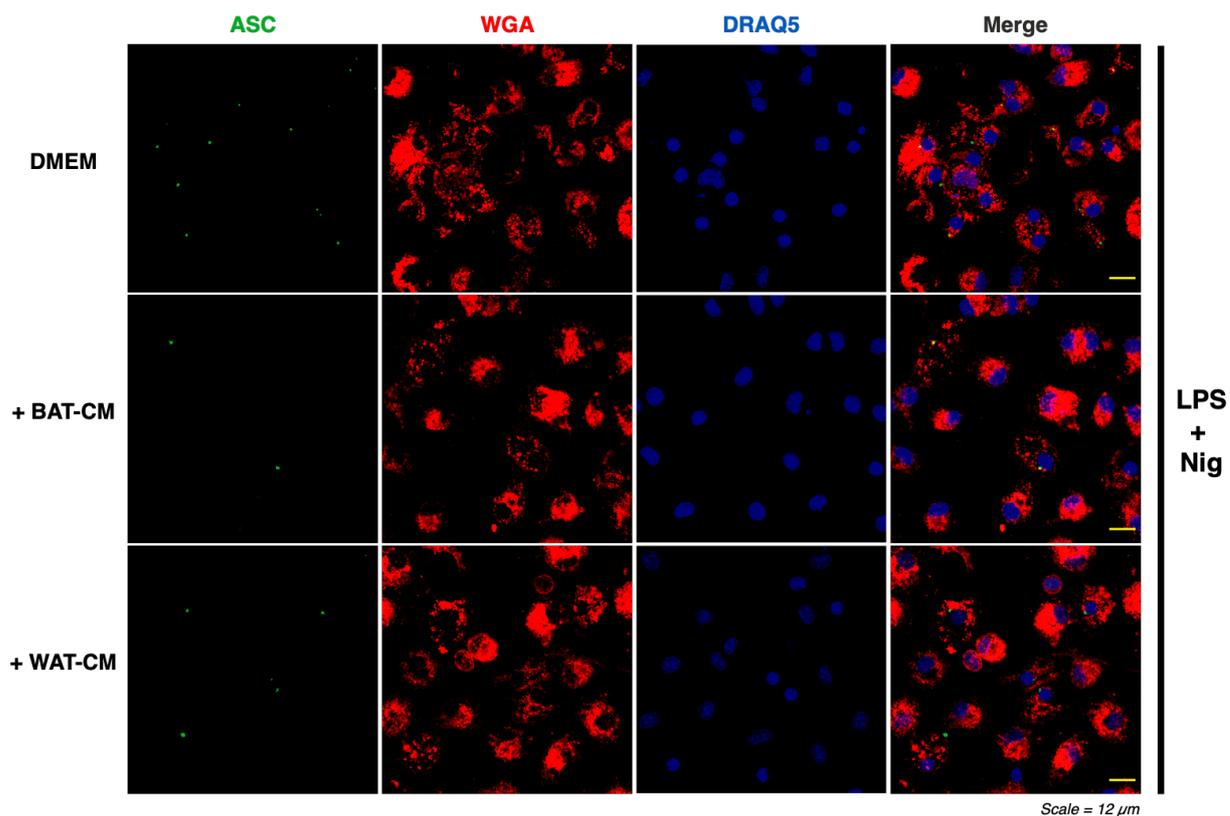


Figura 28 – Oligomerização de ASC e quantificação de specks. BMDMs provenientes de camundongos reporters para ASC-mCitrine cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Microscopia confocal representativa de diferentes experimentos, ASC specks representados em verde (mCitrine) e núcleos em azul (DRAQ-5). Quantificação de ASC specks a partir da razão speck por núcleo para cada condição experimental. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações.

Considerando que o cultivo com CM estava diminuindo os efeitos relacionados à ativação de NLRP3, foi verificado como isso estaria associado com a viabilidade celular de forma mais generalizada. Como anteriormente mencionado, a adição do reagente CTB permite avaliar capacidade metabólica da célula como um indicador de viabilidade. Importante ressaltar que devido ao seu caráter metabólico o tempo de incubação com o reagente varia dependendo

da célula utilizada. Portanto, foi inicialmente realizada uma caracterização cinética, a fim de verificar qual seria o melhor tempo de incubação dos macrófagos (após finalizado o tempo de ativação do inflamassoma) com CTB, para garantir que as análises subsequentes estivessem dentro do melhor intervalo experimental (Figura 29 A e B). Essa caracterização indicou que entre 45 minutos e 1 hora é o melhor tempo de incubação sem que a saturação natural do ensaio atrapalhe a avaliação da viabilidade celular. BMDMs com NLRP3 ativado, porém pré-cultivados com CM BAT e CM WAT, apresentaram recuperação da viabilidade celular quando comparados aos controles sem o meio condicionado. Para avaliação cinética foram utilizados dois ativadores diferentes de NLRP3, nigericina e ATP que apresentaram resultados semelhantes. Como para ambos reagentes a ativação do inflamassoma se dá por meio de alterações no efluxo de potássio, os experimentos seguintes foram conduzidos apenas com nigericina, como em ensaios anteriores (Figura 29 C).

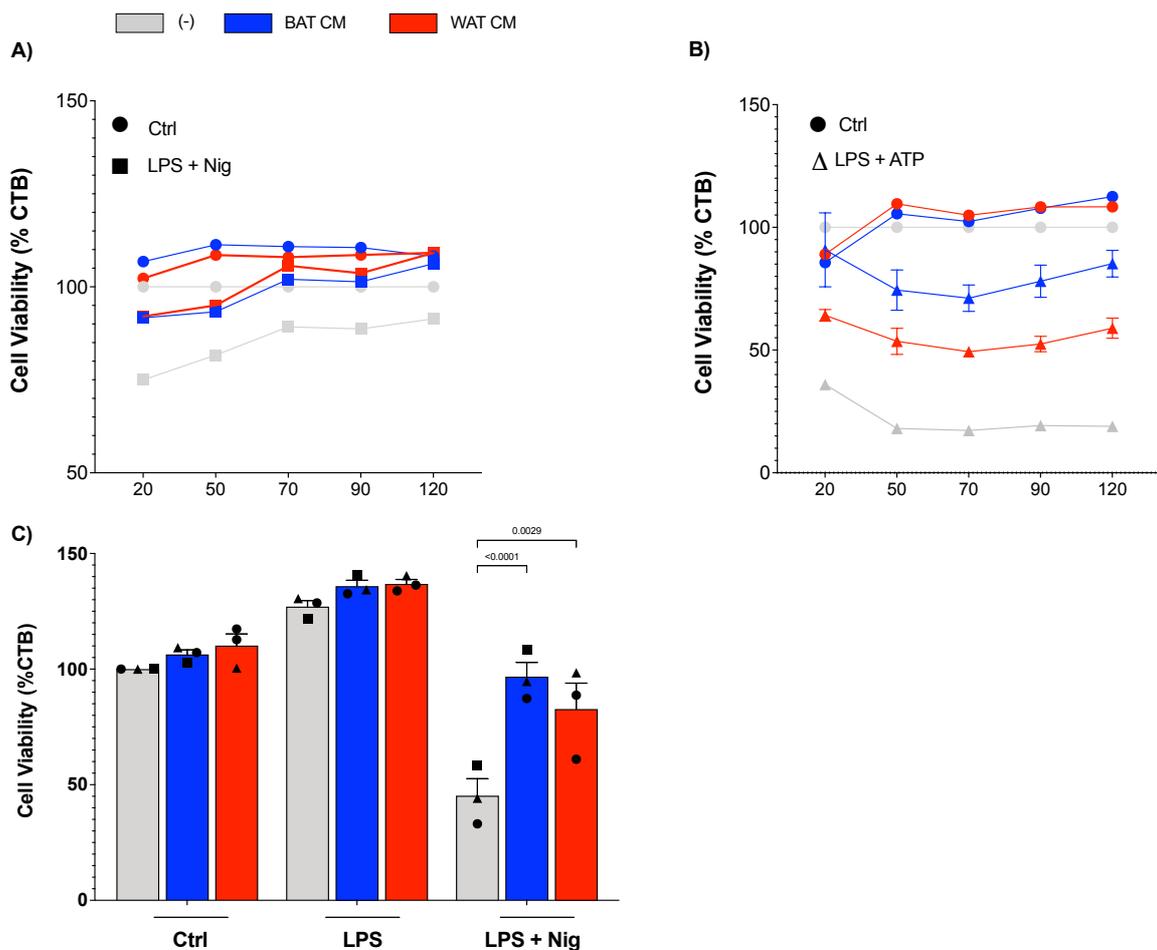


Figura 29 - **Avaliação da viabilidade celular.** BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) ou ATP por 1,5 horas. Cinética de incubação com CTB, gráficos representativos de diferente experimentos, barras de erro padrão não adicionadas para melhor visualização (A e B). Tempo ótimo de incubação com CTB (C). Gráficos representativos

selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações.

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT falha em diminuir a ativação dos inflamassomas AIM2 e NLRC4

Considerando os fenótipos gerados anteriormente, nos perguntamos se esse efeito estaria condicionado à ativação de NLPR3 ou se poderia abranger a ativação de outros sensores. Sendo assim, macrófagos foram transfectados com poly(dA:dT), para ativação do inflamassoma AIM2. Para ativação de NLRC4, foi utilizada uma combinação de BsaK e PrgI, como anteriormente explicado nesse trabalho. Avaliando a secreção de IL-1 β , é notável que o cultivo com meio condicionado dos dois tecidos não foi capaz de diminuir os níveis secretados no sobrenadante em relação aos respectivos controles de ativação de AIM-2 e NLRC4 sozinhos. Para confirmação do fenótipo, foi investigado também um dos fenômenos intracelulares de ativação do inflamassoma, a oligomerização de ASC formando specks. Assim como ocorreu para IL-1 β , a adição de meio condicionado não influenciou o número de specks gerados a partir da ativação de AIM-2 e NLRC4 (Figuras 30 e 31).

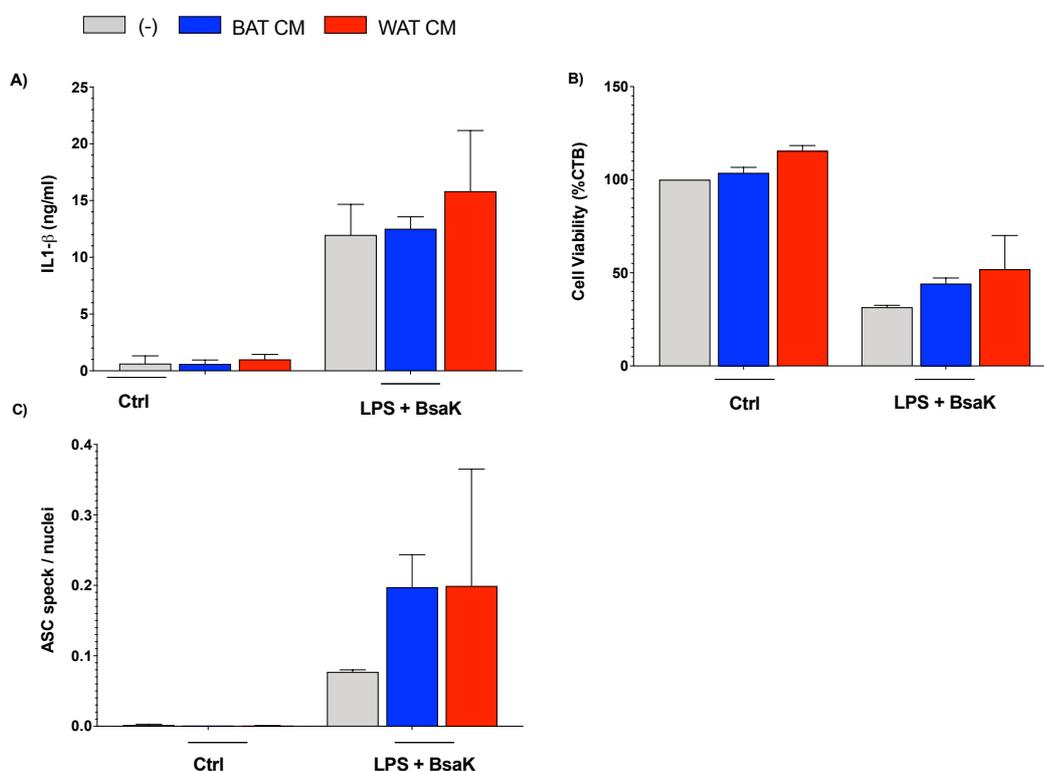


Figura 30 – Ativação do inflamassoma NLRC4. BMDMs provenientes de camundongos reporters para ASC-mCitrine cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de

ativação do inflamassoma NLRC4 utilizando Bsak/PA (0.1/0.5 μ g/mL) por 1,5 horas. Quantificação de IL-1 β por HTRF em sobrenadante livre de células (A). Quantificação de ASC specks a partir da razão speck por núcleo para cada condição experimental (C). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média ou desvio padrão. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações.

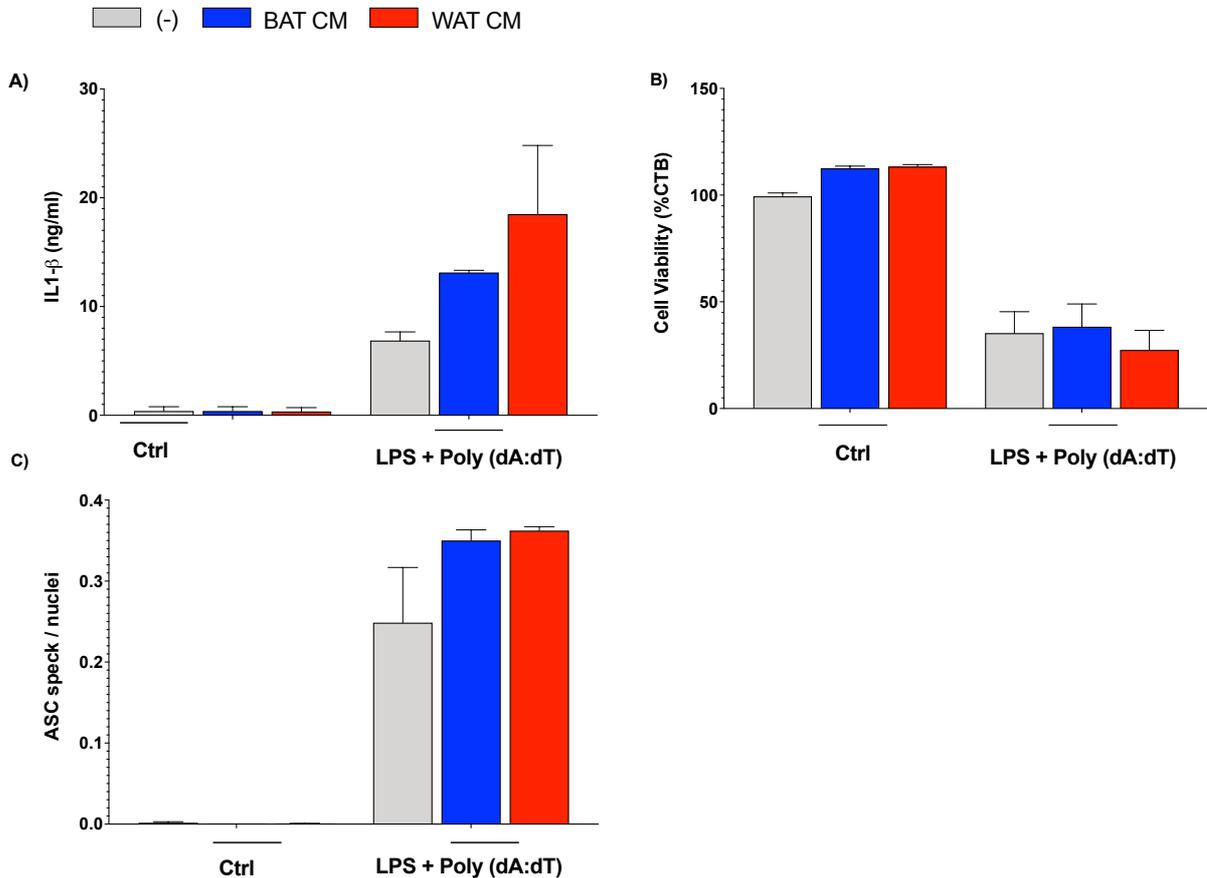


Figura 31 – **Ativação do inflamassoma AIM2.** BMDMs provenientes de camundongos reporters para ASC-mCitrine cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma AIM2 a partir de transfecção com poly (dA:dT) (200 ng) por 1,5 horas. Quantificação de IL-1 β por HTRF em sobrenadante livre de células (A) Ensaio de viabilidade celular (B). Quantificação de ASC specks a partir da razão speck por núcleo para cada condição experimental (C). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média (A and B) ou desvio padrão (D). Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações.

Por fim, foi confirmado um fenótipo contrário em relação à ativação de NLRP3 ao observamos que também não houve resgate da viabilidade celular após ativação dos dois outros inflamassomas.

O momento de adição do meio condicionado influencia diretamente o efeito gerado em macrófagos ativados

Para todos os ensaios anteriores, a adição de meio condicionado ocorreu 1 hora antes da ativação de TLR4 com LPS. O próximo passo foi a avaliação se o mesmo fenótipo seria mantido com a adição de CM BAT e CM WAT após as células passarem 3 horas em cultura com LPS, juntamente com a adição de nigericina. Mais uma vez, CM BAT e CM WAT não reproduziram o fenômeno de recuperação da viabilidade apresentado anteriormente (Figura 32A). O mesmo ocorreu na avaliação de ASC specks: ao se comparar o momento de adição do meio condicionado, o mesmo efeito não foi observado em diferentes tempos (Figura 32B).

Ao utilizar macrófagos imortalizados que super expressam NLRP3, tornou-se possível a avaliação de fenótipos sem que houvesse adição de LPS. Por não ser possível avaliar a liberação de IL-1 β (transcrição de pró IL-1 β é dependente da ativação de NF κ B por TLR), o ensaio realizado com esse tipo celular é a quantificação de ASC specks (Figura 32C). O cultivo desses macrófagos imortalizados com meio condicionado de BAT e WAT, e posterior indução da formação de specks com nigericina não resultou em uma redução do número dessas estruturas.

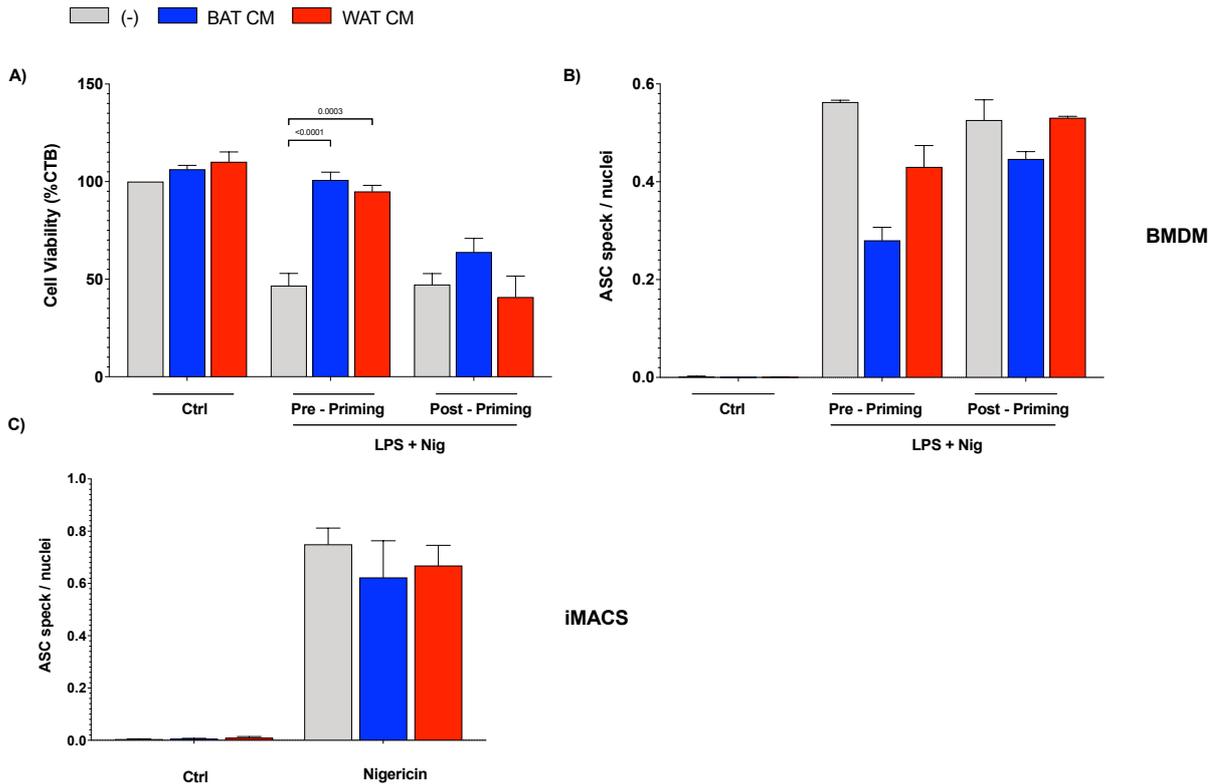


Figura 32 – Efeito da adição de meio condicionado em diferentes momentos. BMDMs provenientes de camundongos reporters para ASC-mCitrine cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) adicionado 1 hora antes do tratamento com LPS ou juntamente com a nigericina. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml - 3 horas) seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Ensaio de viabilidade celular (A). Quantificação de ASC specks a partir da razão speck por núcleo para cada condição experimental (B). Macrófagos murinos imortalizados, repórteres para ativação do inflamassoma, fusionados com ASC fluorescente cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou ativados com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Quantificação de ASC specks a partir da razão speck por núcleo para cada condição experimental (C). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média ou desvio padrão. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações.

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT altera a resposta de macrófagos a ativação de TLR

Considerando a hipótese de que o meio condicionado estaria influenciando de forma mais ampla a resposta inflamatória, o próximo passo consistiu em investigar a secreção de TNF- α , IL-6 e IL-10. A secreção de TNF- α é um dos mais claros marcadores da resposta inflamatória, sendo largamente caracterizado sua liberação por macrófagos em resposta a ativação de TLR4 por LPS. Mais uma vez, seguindo o padrão das outras citocinas pró-inflamatórias anteriormente avaliadas, o cultivo com meio condicionado reduziu os níveis de TNF- α liberados por macrófagos (Figure 33 A). Não foi uma surpresa encontrar altos níveis de IL-6 já presentes no

meio condicionado puro (Figure 33 B), considerando a relação intrínseca dessa citocina com adipócitos (Han; White; Perry *et al.*, 2020). IL-10 foi a primeira citocina a aumentar em relação ao controle não sendo consequência apenas da sua presença no meio condicionado puro (Figure 32 C).

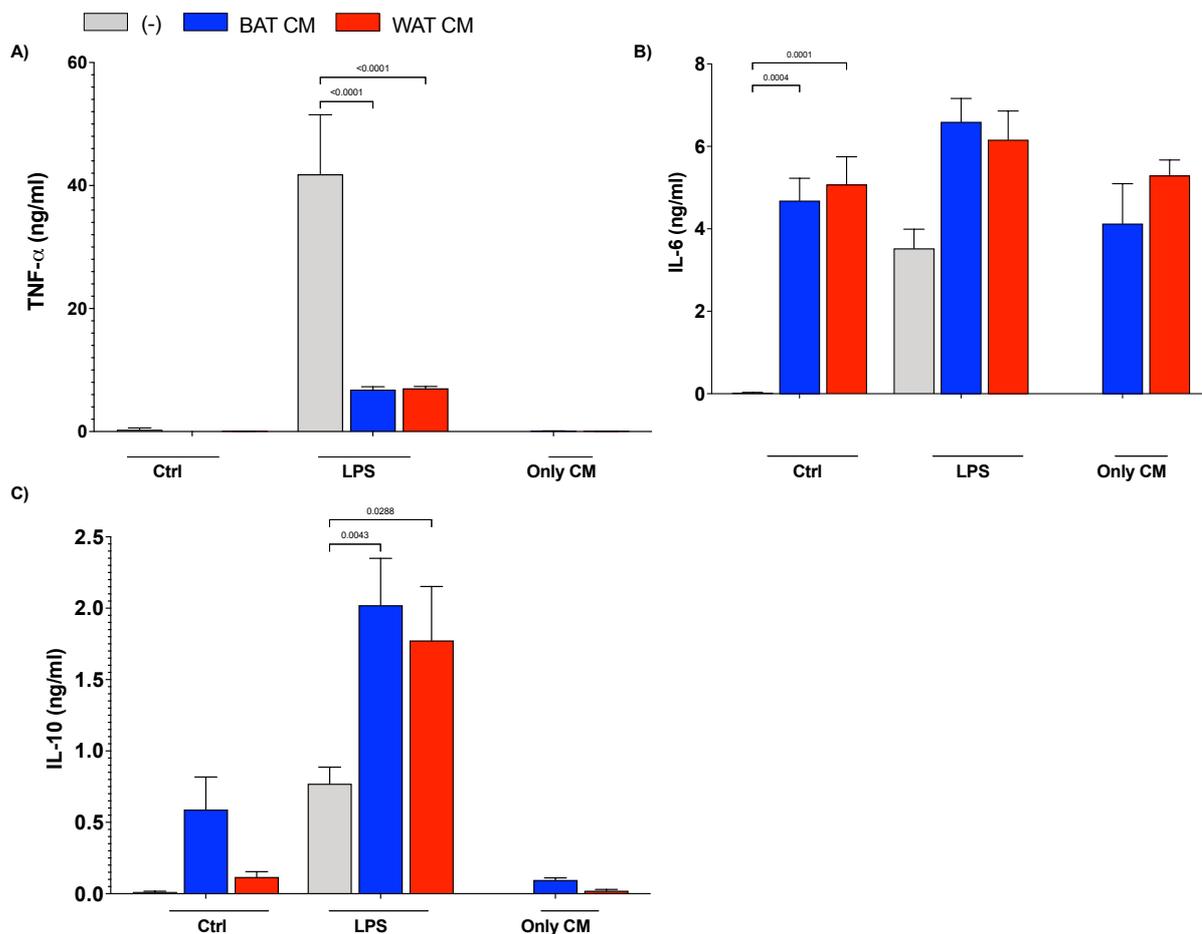


Figura 33 - **Quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-10 por HTRF(A e B) ou ELISA (C).** Sobrenadante livre de células, proveniente após centrifugação, coletado a partir de BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas. Quantificação de cada citocina também foi realizada em uma alíquota de meio condicionado puro, previamente separada antes do cultivo com macrófagos ser iniciado. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Todos os experimentos até aqui apresentados apresentam um fenótipo de ação anti-inflamatória após a ativação de TLR4, investigamos então se seria algo exclusivo para esse receptor. Seguindo o mesmo delineamento experimental e apenas trocando LPS pelos agonistas Pam3CysK4 e R848. Pam3CysK4, um lipopeptídeo sintético que mimetiza aqueles encontrados na parede celular de bactérias, é um forte ativador de TLR2, que em cooperação com TLR1

induzem a ativação de NF- κ B (Kang; Nan; Jin *et al.*, 2009). Já a imidazoquinolina R848 é um potente agonista de TLR7 e TLR8 (Michaelis; Norgard; Zhu *et al.*, 2019). O que encontramos foi que independente do receptor ativado, o cultivo com meio condicionado foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , recuperar a viabilidade celular e aumentar os níveis de IL-10 (Figura 34).

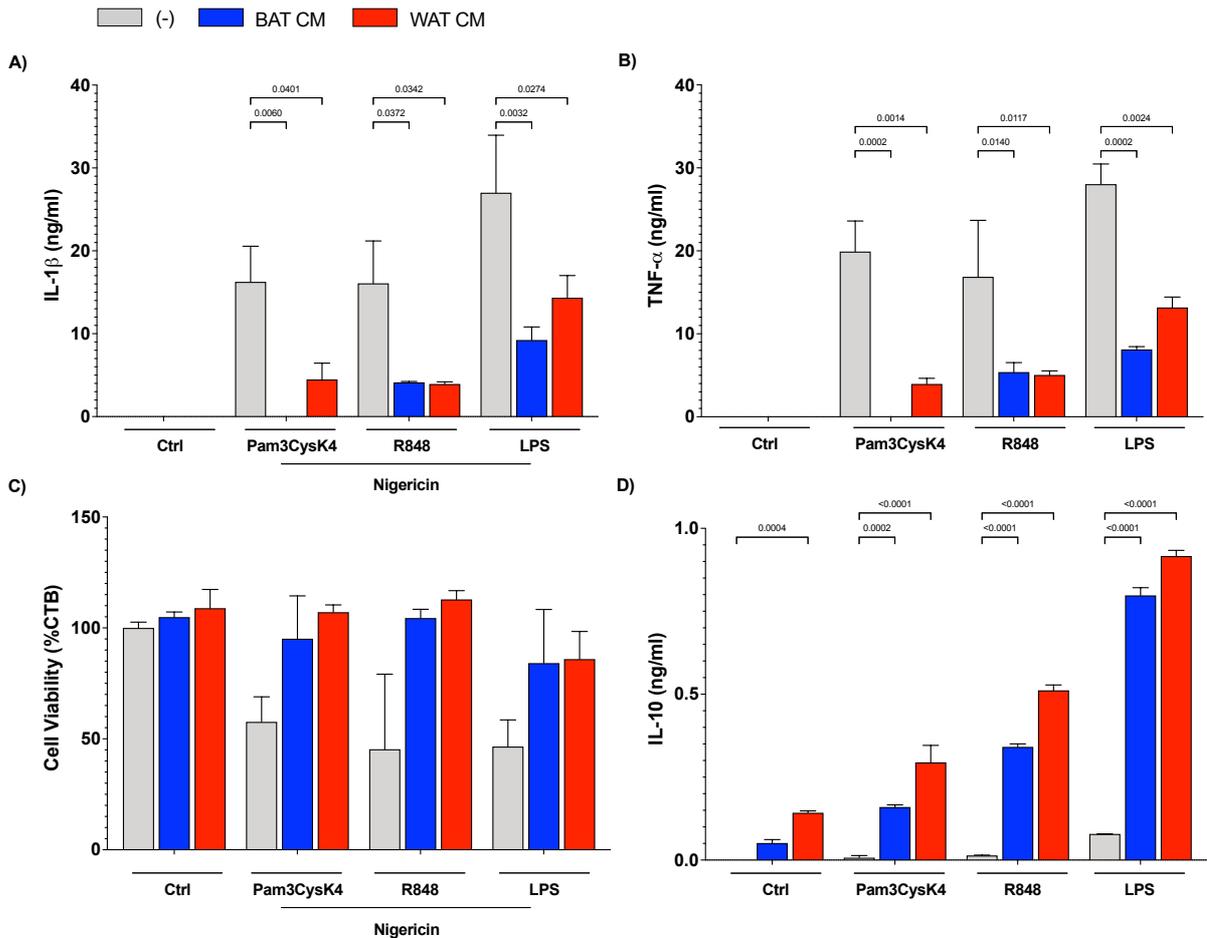


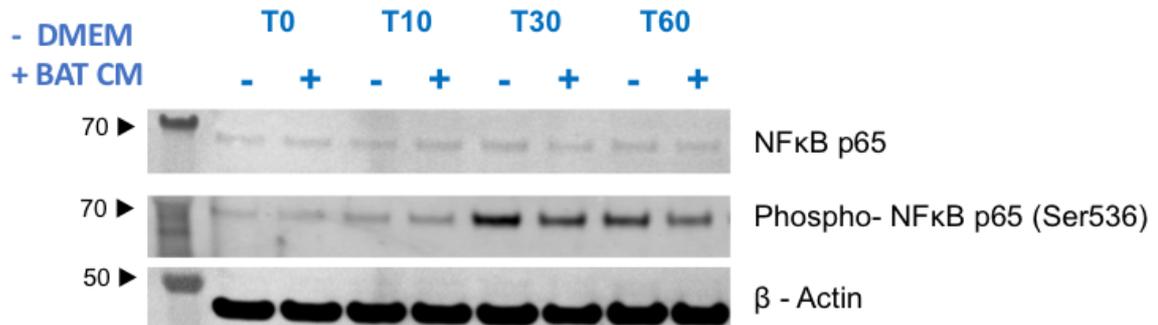
Figura 34 - Ação de CM BAT e CM WAT sobre a ativação de TLR 2/1 e TLR7/8. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com Pam3CysK4 (1 μ g/mL); R848 (1 μ g/mL) ou LPS (200ng/ml) por 3 horas, seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Quantificação de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por HTRF. Ensaio de viabilidade celular (C). Dosagem de IL-10 por ELISA (D). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média ou desvio padrão.

Tendo em conta que a ativação de diferentes TLRs levou ao mesmo fenótipo e que as sinalizações subsequentes iniciadas a partir desses receptores culminam com ativação do fator de transcrição NF- κ B, esse passou a ser o nosso próximo ponto de análise. A indução de genes pró-inflamatórios por NF- κ B pode ocorrer de forma canônica e não canônica, sendo a primeira mais comum e associada com uma resposta inflamatória rápida e reversível. A fosforilação em sítios específicos das sub-unidades de NF- κ B influencia a interação com outros fatores,

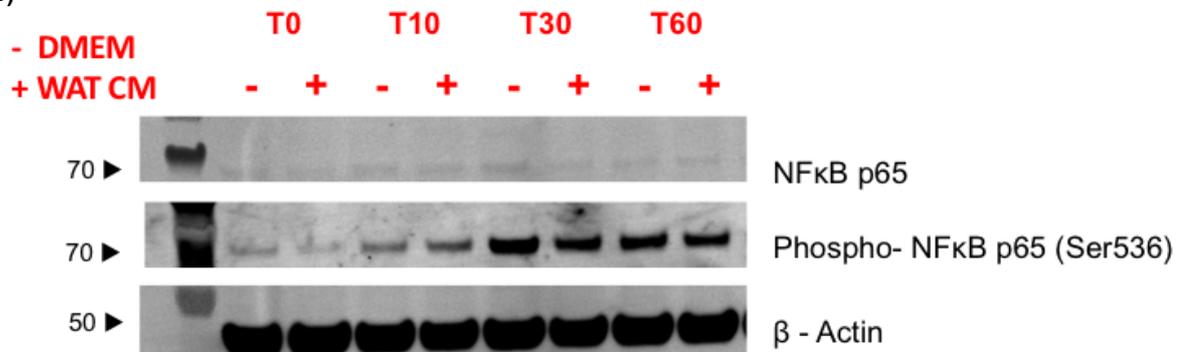
estabilidade, atividade de transcrição e regulação dos dímeros de NF- κ B. A subunidade p65 é uma das mais comumente estudadas através da análise dos seus alvos mais comuns de fosforilação, S276 e S536. A fosforilação de p65 induz uma mudança conformacional, que impacta a ubiquitinação e estabilidade de p65, bem como a interação proteína-proteína. A fosforilação de NF- κ B é uma das primeiras etapas dentro da resposta inflamatória, considerando que é o ponto de partida para os vários processos subsequentes. Portanto, a avaliação desse fenômeno ocorreu nos tempos iniciais após a adição de LPS. Observamos que 30 minutos após a adição de LPS temos a banda mais evidente de Ser536 em macrófagos que não receberam o meio condicionado e uma diminuição da fosforilação é evidente em células cultivadas com CM BAT e WAT (Figura 35 A e B).

A proteína AKT (*protein kinase B*) é uma quinase envolvida em diversos processos relacionados a apoptose, crescimento celular e metabolismo e também possui atuação da resposta inflamatória, destacando-se seu papel regulatório na liberação de IL-10 (Dhingra; Bagchi; Ludke *et al.*, 2011). Moreira e colaboradores também demonstraram que o uso de meio condicionado proveniente de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo promove um aumento de liberação de IL-10 em macrófagos em um processo regulado pela via de sinalização AKT/mTOR (Souza-Moreira; Soares; Dias *et al.*, 2019). No presente trabalho, após 30 minutos de adição de LPS observamos um aumento da fosforilação de AKT em macrófagos cultivados com o meio condicionado dos dois tecidos (Figura 35 C).

A)



B)



C)

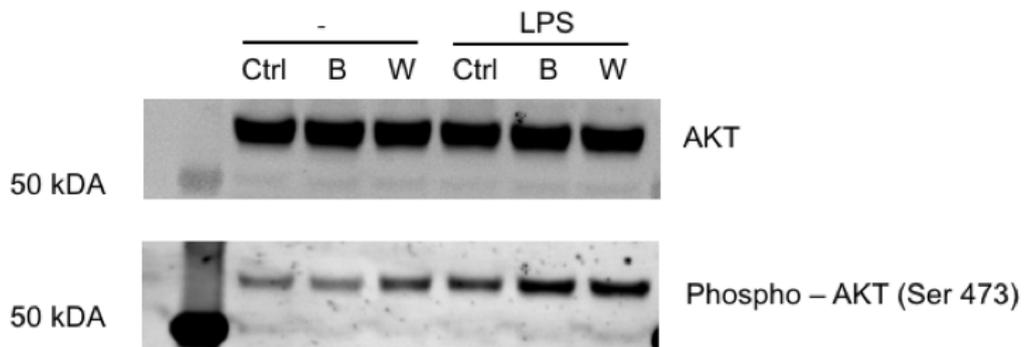


Figura 35 - Western blot para identificação de proteínas fosforiladas a partir do lisado de de BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml) por diferentes períodos de tempo (A e B) ou 30 minutos (C). Géis representativos de um grupo de experimentos independentes.

Avaliação da expressão gênica de macrófagos cultivados com meio condicionado de BAT e WAT

Além das modulações a nível proteico como fosforilações e secreção de citocinas, nos perguntamos se o cultivo com meio condicionado seria capaz de fazer alterações a nível de mRNA. Submetemos amostras de RNA de BMDMs cultivados com meio condicionado e estimulados com LPS por 1 hora para análise de sequenciamento de nova geração (Figuras 36 até 40). Já foi demonstrado que a resposta inflamatória induzida pela ativação de TLR4 é baseada na indução de uma cascata de transcrição com eventos marcados temporalmente. Escolhemos o tempo de apenas 1 hora com LPS baseando-nos pelos resultados obtidos de fosforilação de NFkB, já que a ação do meio condicionado já estaria influenciando um processo tão inicial nos estágios da inflamação.

Análise de componente principal evidencia que apesar dos grupos representantes de BMDMs cultivados com meio condicionado estarem agrupados em proximidade existe uma clara distância em relação aos macrófagos estimulados com LPS (Figura 36 A). De fato, quando observamos o agrupamento hierárquico das amostras considerando apenas os DEGs vemos que o grupo controle não estimulado está em maior proximidade com o grupo estimulado com LPS do que com qualquer um dos grupos que recebeu meio condicionado (Figura 36 B). O mapa de calor nos permite ainda identificar que o cultivo com meio condicionado na presença ou ausência de LPS modifica de forma geral o padrão de expressão gênica dos macrófagos.

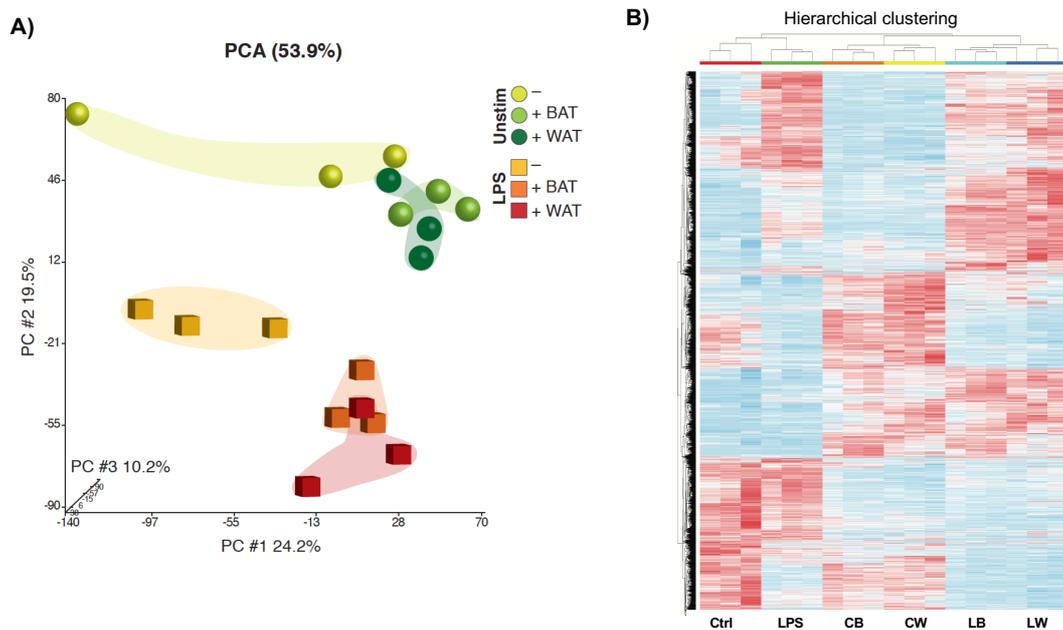


Figura 36 - **Modificações no padrão global de expressão gênica de BMDMs cultivados com meio condicionado e estimulados com LPS.** BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 1 horas. (A) Análise de componente principal mostrando padrão de agrupamento das diferentes condições e entre diferentes replicatas biológicas (cada símbolo representa amostra gerada a partir de um experimento individual). (B) Mapa de calor representando análise de agrupamento hierárquico de DEGs. Mensuração da distância dos dendogramas foi realizada a partir de dissimilaridade Euclidiana.

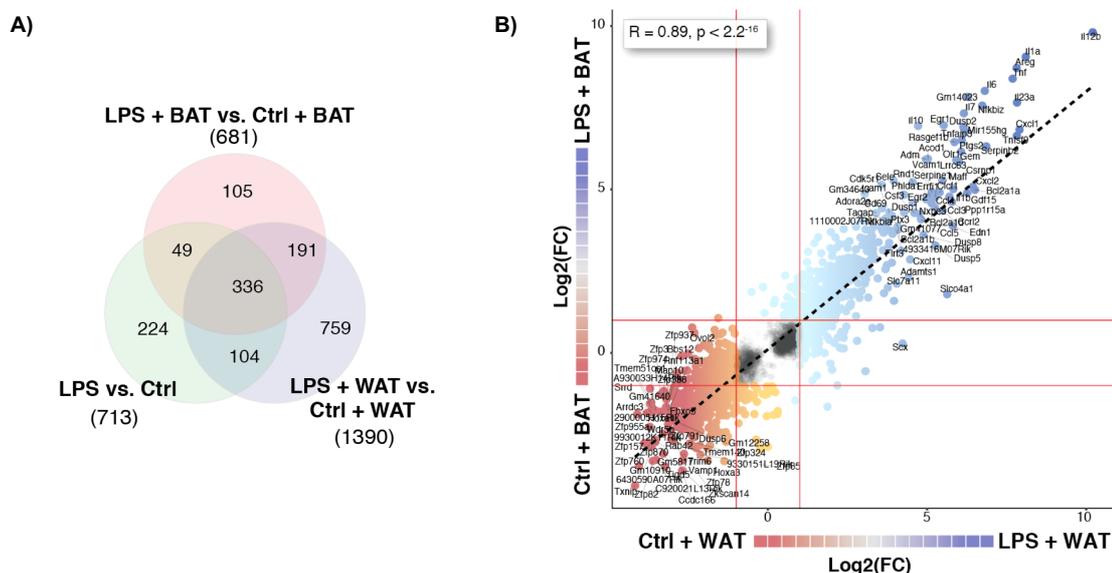


Figura 38 - Modulação da expressão gênica por cultivo com meio condicionado em BMDMs estimulados com LPS. A) Diagrama de Venn representando os números de DEGs, assim como sobreposições, a partir da comparação entre BMDMs com CM BAT ou CM WAT e estimulados ou não com LPS. B) Gráfico de dispersão DEGs que apresentando níveis de expressão de genes individuais de BMDMs cultivados com CM BAT ou CM WAT na presença ou ausência de LPS. mostraram mudanças nos níveis de expressão pelo menos ± 2 vezes foram identificados por One-Way ANOVA (P-valor $< 0,05$) entre os diferentes grupos testados.

Afim de melhor direcionar nossas interpretações partindo da grande quantidade de genes modulados nos diferentes cenários, realizamos uma análise de enriquecimento de ontologia genética partindo de listas de genes geradas com diferentes comparações de interesse. Observamos que a modulação gênica gerada por CM BAT e WAT influencia de forma expressiva genes associados com regulação biológica, processos do sistema imune e resposta a estímulos, o que condiz com os dados do fenótipo descrito nesse trabalho (Figura 39). Olhando os termos derivados dentro da categoria de processos do sistema imune é interessante observar

que mesmo em células que não houve nenhum contato com LPS temos uma alta porcentagem de genes super regulados em relação a homeostase de leucócitos (Figura 40).

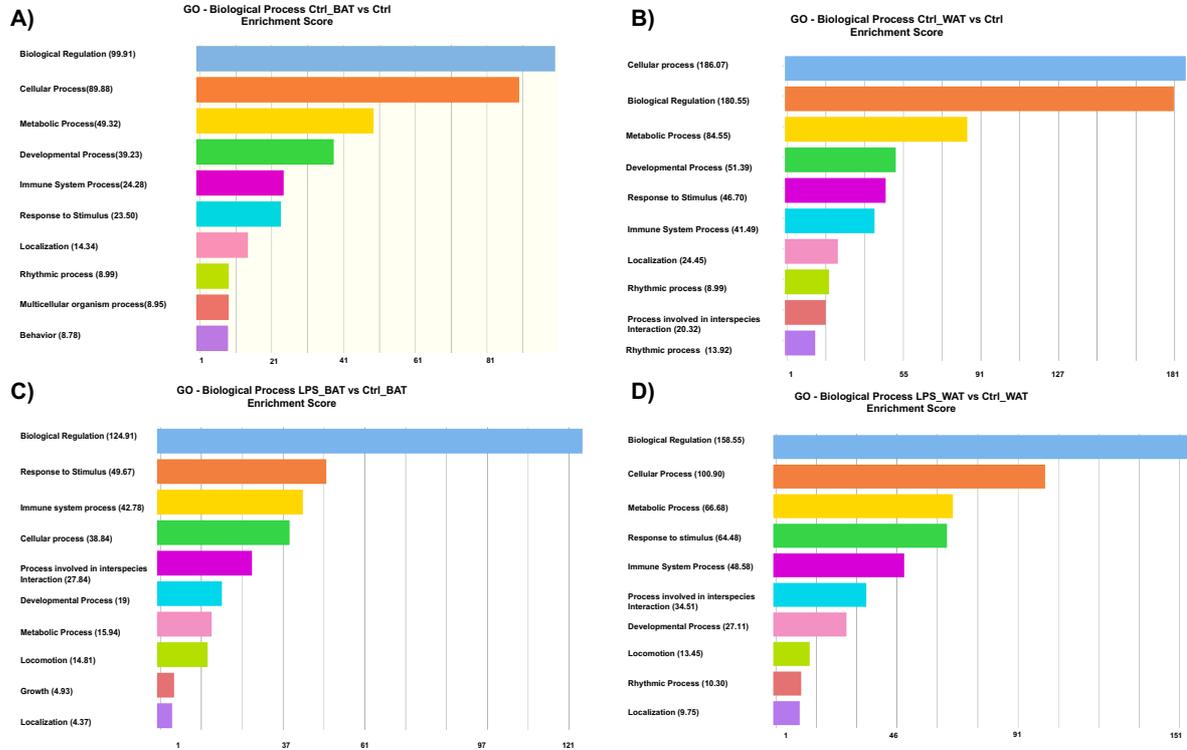
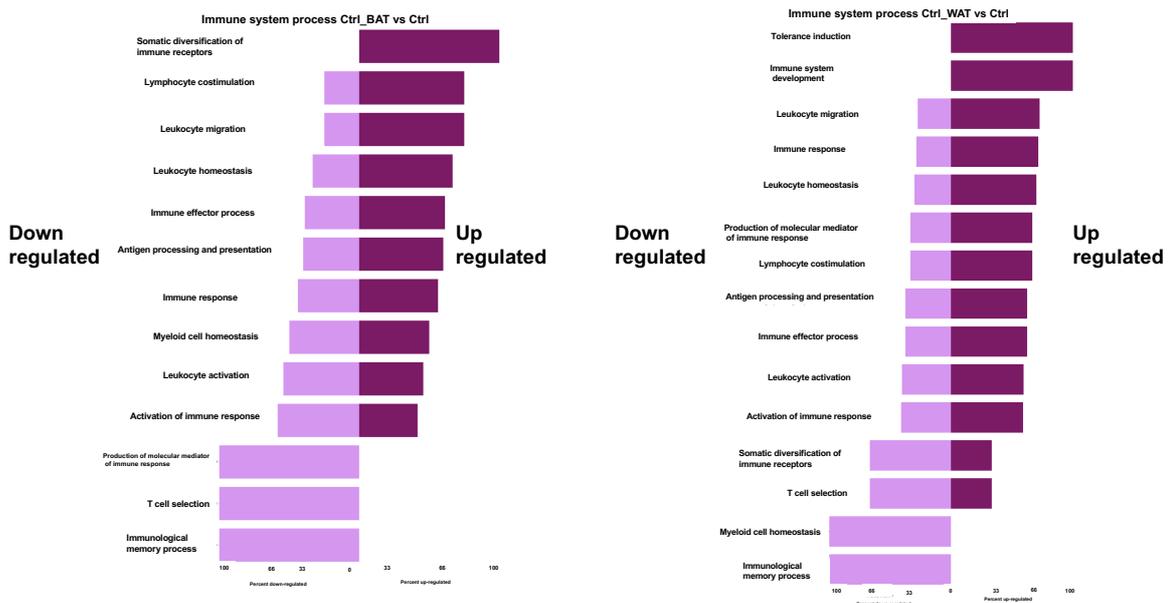


Figura 39 - **Análise de ontologia genética – Processos Biológicos.** Análise de enriquecimento de genes de DEGs relativos a comparações entre BMDMs cultivados com CM BAT (A e C) ou CM WAT (B e D) com macrófagos não estimulados (A e B) ou estimulados com LPS (C e D). Top 10 de categorias de Processos Biológicos enriquecidos calculados a partir de Teste Exato de Fisher restringindo a análise a grupos funcionais com mais de 3 genes.



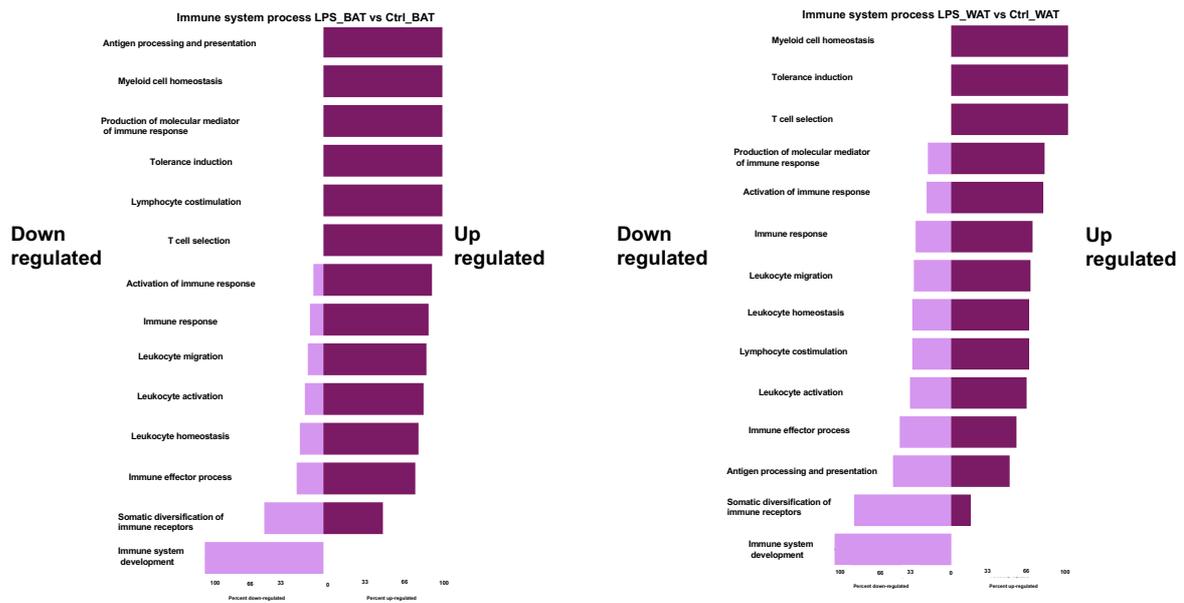


Figura 40 - **Análise de ontologia genética “child terms” Processos do sistema Imune.** Gráficos tipo floresta mostrando termos derivados da categoria “Processos do Sistema Imune” dentro de processos biológicos obtidos através de análise de enriquecimento de genes de DEGs relativos a comparações entre BMDMs cultivados com CM BAT (A e C) ou CM WAT (B e D) com macrófagos não estimulados (A e B) ou estimulados com LPS (C e D). Processos Biológicos enriquecidos calculados a partir de Teste Exato de Fisher restringindo a análise a grupos funcionais com mais de 3 genes.

Ao se avaliar a resposta inflamatória de macrófagos um fator importante a ser considerado são os diferentes fenótipos de macrófagos já caracterizados (Orecchioni; Ghosheh; Pramod *et al.*, 2019). A literatura apresenta uma extensa caracterização de como a interação entre macrófagos e adipócitos é capaz de modular o perfil de polarização macrofágica (Ruggiero; Key; Kavanagh, 2021) (Li; Yun; Mu, 2020) Com a intenção de validar os resultados gerados a partir do sequenciamento, montamos um painel de genes associados a clássica polarização M1 e M2 feita por RT q-PCR. Todos os genes tiveram sua expressão relativa mensurada em relação a expressão do gene constitutivo *Actb* que codifica a proteína β -actina.

Indo de acordo com os resultados primeiramente apresentados sobre a redução da ativação do inflamassoma NLRP3, observamos uma diminuição na expressão de *Il-1 β* e *Nlrp3* ativados com LPS em macrófagos cultivados com CM BAT e CM WAT (Figure 41 A e 41 B). O mesmo é encontrado para expressão de *Tnf- α* (Figure 41 C). Macrófagos aumentam a produção da enzima óxido nítrico sintase, que utiliza L-arginina como substrato para produção de óxido nítrico, em resposta a estímulos inflamatórios (Rath; Müller; Kropf *et al.*, 2014) A expressão de *Nos2* é, portanto, usada como um clássico representante da assinatura M1 em macrófagos. Acompanhando o resultado dos outros genes associados a resposta pró-

inflamatória, o cultivo com meio condicionado também reduz a expressão desse gene (Figure 41 D).

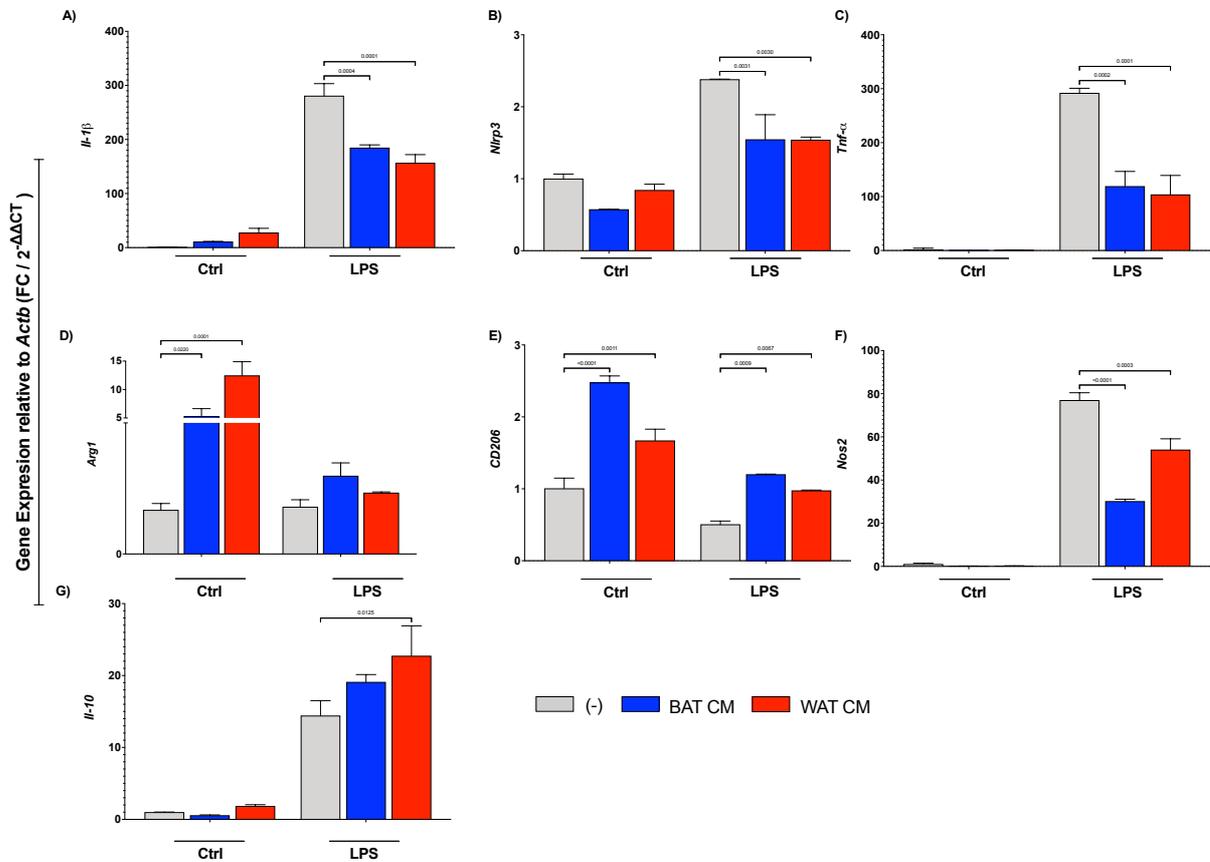


Figura 41- Expressão gênica de IL-1 β , Nlrp3, Tnf- α , Nos2, Arg1, Cd206 e IL-10 usando qPCR . BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 1 horas. Barras representam a média em conjunto com o desvio padrão. Gráficos representativos de um conjunto de experimentos independentes.

A enzima arginase compete com a óxido nítrico sintase pelo substrato L-arginina sendo uma reguladora da resposta inflamatória induzindo a produção de outros atores da resposta M2 (Rath; Müller; Kropf *et al.*, 2014). Encontramos que a expressão de *Arg1* já é up regulada em macrófagos cultivados com meio condicionado dos dois tecidos (Figure 41 E). O receptor transmembranar CD-206, também conhecido como MRC1 (*C-type mannose receptor 1*) é considerado um marcador M2 clássico devido ao aumento de sua expressão em resposta a altos níveis de IL-4 e IL-10 (Murray; Allen; Biswas *et al.*, 2014). Mais uma vez encontramos níveis superiores em macrófagos cultivados com meio condicionado, e mesmo que a adição de LPS tenha reduzido parcialmente esses níveis, como esperado, ainda assim os níveis se mantiveram superiores em relação a células que não tiveram o pré-cultivo (Figure 41 F). Assim como encontrado na quantificação de citocinas em sobrenadante, a expressão gênica de *IL-10* foi maior em macrófagos que tiveram contato com CM BAT e CM WAT (Figure 41 G).

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT não afeta a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais murinos ou macrófagos humanos

Macrófagos peritoneais, assim como BMDMs, são largamente utilizados como fontes de células primárias para estudos *in vitro*. Trabalhos que compararam a resposta desses dois tipos celulares sob as mesmas condições experimentais evidenciam similaridades morfológicas ao se analisar os padrões de tamanho e granulosidade (Zajd; Ziemba; Miralles *et al.*, 2020). Brunner e colaboradores mostram que cultivo de macrófagos peritoneais com meio condicionado derivado de tecido adiposo epididimal de animais submetidos a HFD diminuem a fosforilação de AKT (Brunner; Vogel; Lercher *et al.*, 2020). Entretanto, ao se avaliar respostas funcionais baseada em expressão gênica, liberação de citocinas, polarização e captação de lipídeos as semelhanças e diferenças podem variar de acordo com as condições experimentais utilizadas (Bisgaard; Mogensen; Rosendahl *et al.*, 2016). Nesse trabalho, utilizando o mesmo delineamento experimental para estímulo de TLR4 com posterior ativação do inflamassoma NLRP3, encontramos que o cultivo com meio condicionado de BAT e WAT não gera o mesmo perfil redutor de resposta inflamatória em macrófagos peritoneais que foi anteriormente encontrado em BMDM (Figura 42).

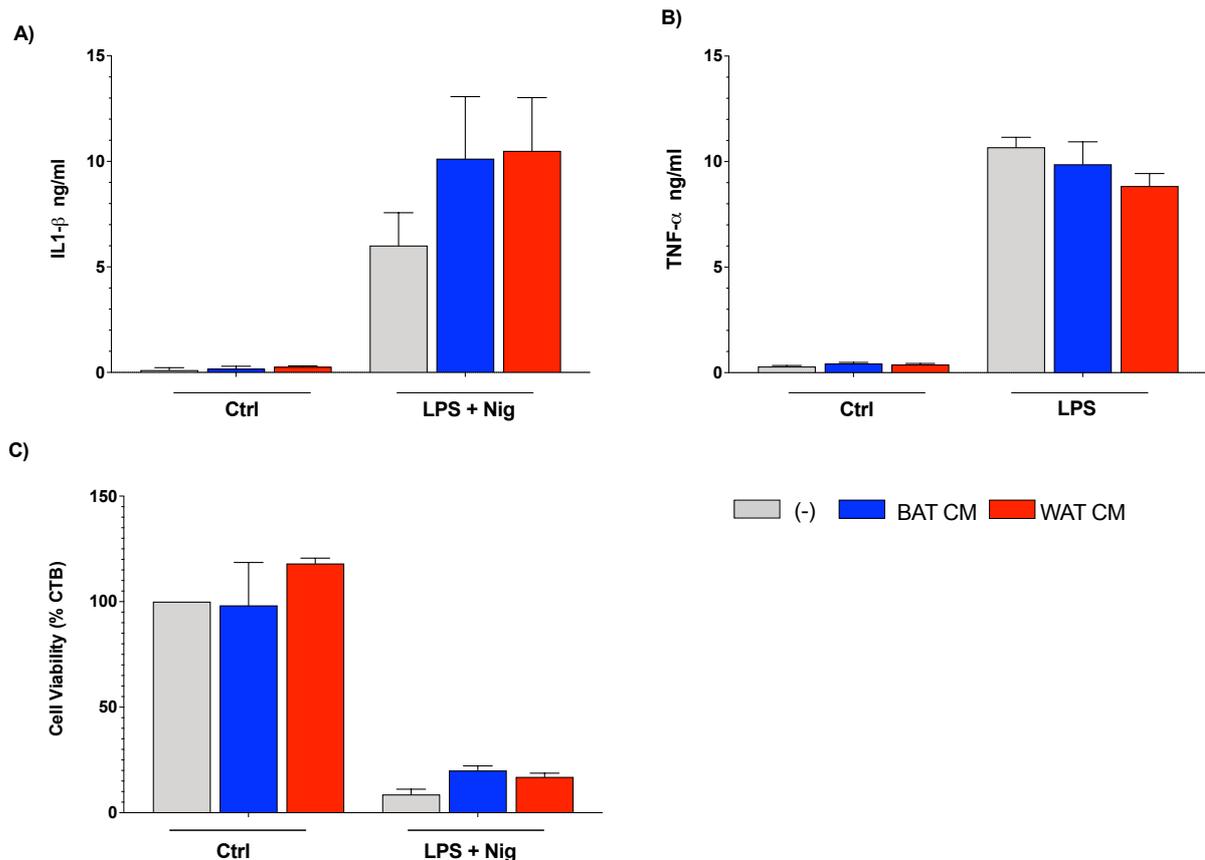


Figura 42 - **Efeito do meio condicionado em macrófagos peritoneais.** Macrófagos peritoneais cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); ou primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Quantificação de IL-1 β (A) e TNF- α (B) por HTRF. Ensaio de viabilidade celular (C). Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detectação do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Mesmo com as limitações evidentes de se usar meio condicionado murinho em células humanas, consideramos ainda válido explorar essa pergunta já que não temos conhecimento do fator preciso do meio condicionado que induzem os fenótipos aqui apresentados, e a depender da natureza de sua natureza, a diferença entre as espécies poderia não ser um fator limitante. Entretanto, não encontramos recuperação da viabilidade celular ou diminuição da secreção de TNF- α após estimular TLR4 e TLR1/2 (Figure 43A e B).

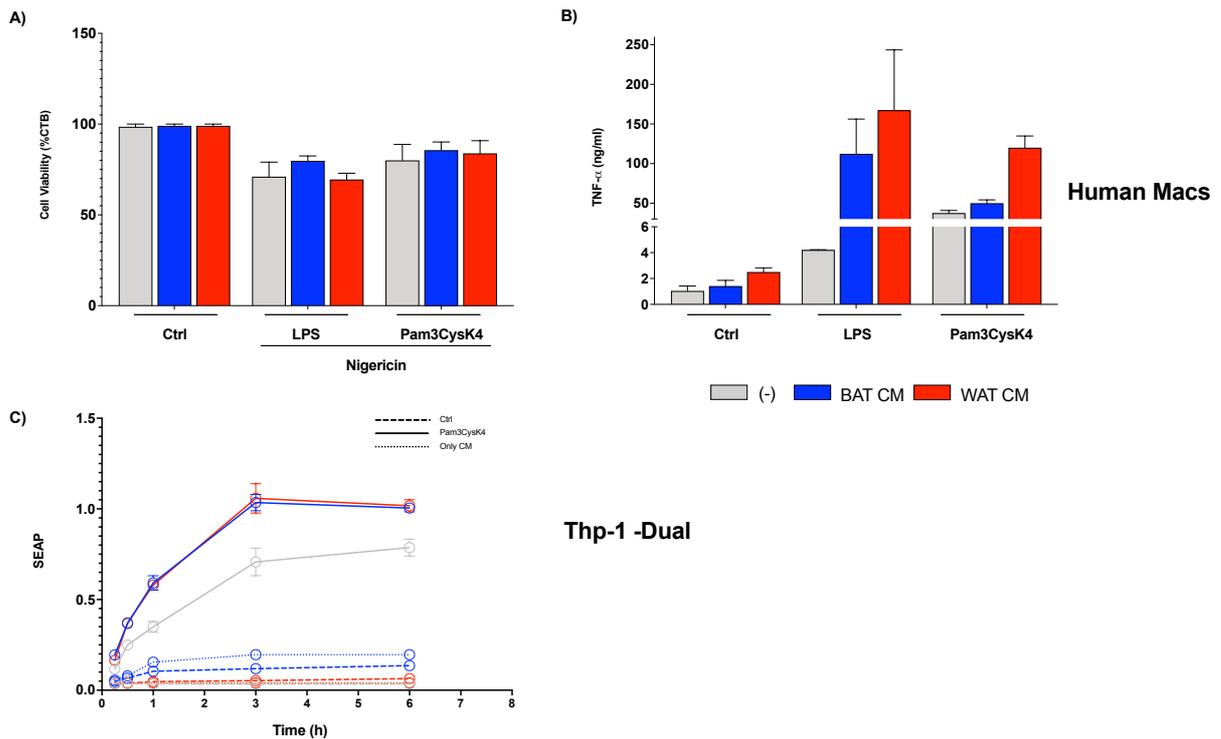


Figura 43- **Efeito do meio condicionado em macrófagos humanos.** Macrófagos primários humanos cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) ou Pam3CysK4 (1 μ g/mL) por 3 horas, seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Ensaio de viabilidade celular (A). Quantificação de TNF- α (B) por HTRF. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. (C) Monócitos humanos da linhagem imortalizada Thp-1 foram cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora e posteriormente tratados por 24 horas com Pam3CysK4 (1 μ g/mL) por 24 horas. Os monócitos foram então incubados com o reagente QUANTI-Blue e a densidade óptica conferida em diferentes intervalos de tempo utilizando 620 nm. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Considerando a clara diminuição da fosforilação de NF- κ B anteriormente apresentada, tentamos utilizar o sistema *NF- κ B SEAP Reporter Monocytes* (Invivogen) para avaliar a transdução de sinal da via, monitorando assim sua ativação. Todavia, o que encontramos nesse ensaio foi um aumento da atividade de *NF- κ B* a partir da ativação de TLR1/2 em monócitos cultivados com meio condicionado, o que poderia ser associado ao fato de a linhagem de monócitos utilizadas também ser humana (Figura 43 C).

Caracterização parcial do meio condicionado: efeitos do aumento de temperatura e tratamento com nuclease

Em uma tentativa de contribuir na identificação de possíveis mecanismos pelos quais o cultivo com meio condicionado é capaz de alterar o fenótipo em macrófagos primados com LPS, optamos por pré tratar o meio condicionado de forma a restringir a atuação de proteínas e ácidos nucleicos. A inativação de meio condicionado por calor pode afetar diretamente o efeito fenótipo estabelecido na célula alvo. Liu e colaboradores mostram que ao submeterem o meio condicionado derivado de células tumorais a altas temperaturas o fenótipo previamente encontrado de prevenção da apoptose em células endoteliais (que receberam o meio condicionado) foi perdido (Liu; Davis; Ramirez *et al.*, 2001). Em nossos resultados observamos que não há diferença na modulação de liberação de TNF- α e recuperação da viabilidade induzida por CM BAT e CM WAT em BMDMs se utilizarmos meio condicionado que foi submetido previamente a inativação por calor (Figura 44 A e B). Paralelamente, o pré tratamento com endonuclease também não alterou as propriedades do meio condicionado a ponto de impedir o estabelecimento do fenótipo de diminuição da inflamação em macrófagos (Figura 44 C e D).

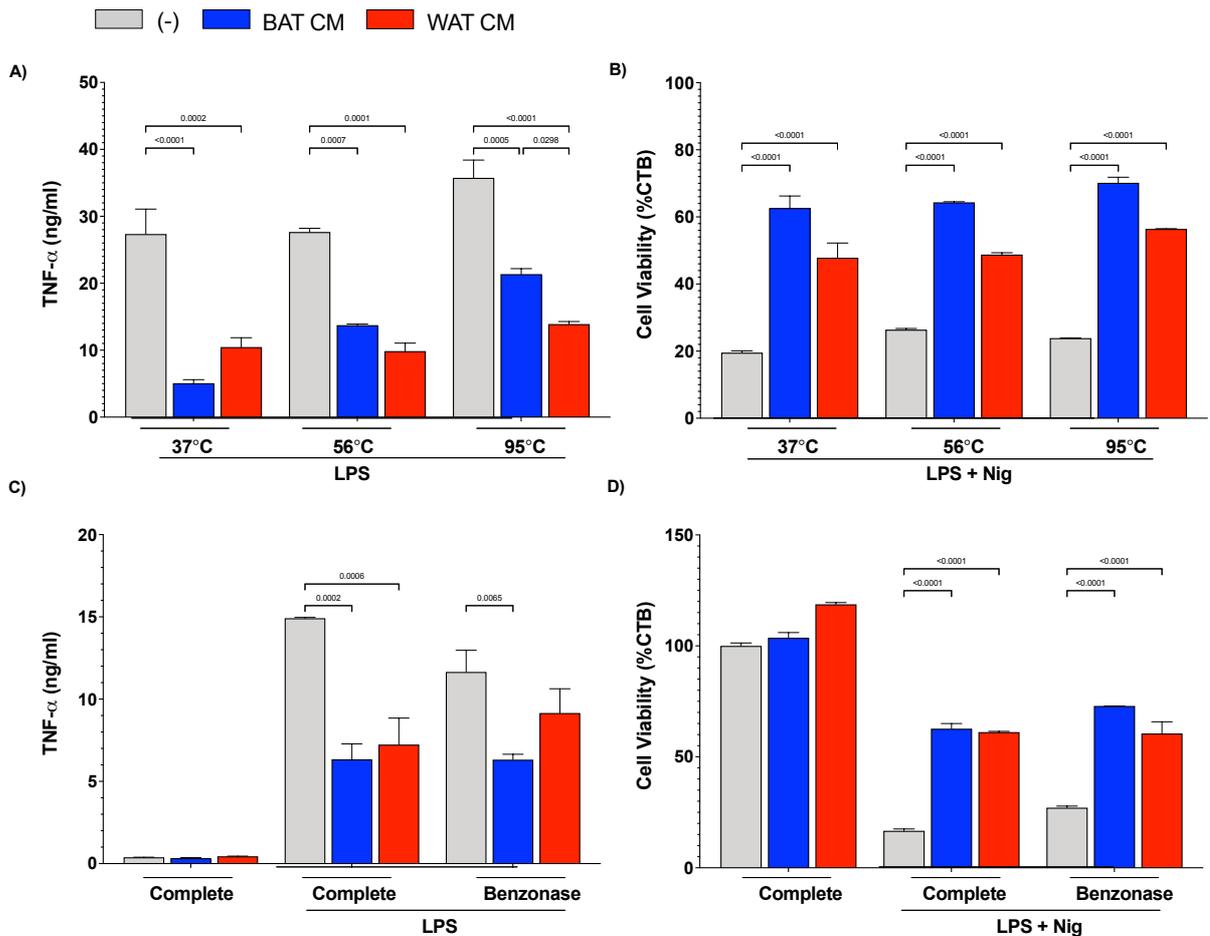


Figura 44 - **Inativação por calor ou tratamento com endonuclease do meio condicionado.** Macrófagos primários humanos cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) por 1 hora. Meio condicionado foi submetido a inativação por calor por 20 minutos ou tratado com benzonase com seguinte inativação da enzima por calor. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) ou Pam3CysK4 (1 μ g/mL) por 3 horas, seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μ M) por 1,5 horas. Quantificação de TNF- α (A e C) por HTRF. Ensaio de viabilidade celular (B e D). Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Yamanishi e colaboradores mostram um efeito direto da ausência de IL-18 no metabolismo lipídico e adipogênese do tecido adiposo marrom de camundongos (Yamanishi; Maeda; Kuwahara-Otani *et al.*, 2018). Anteriormente apresentamos que o meio condicionado utilizado nesse trabalho possui quantidades significativas de IL-18. Levando em conta esses dois fatos, investigamos também se ao utilizar meio condicionado de animais *IL-18*^{-/-} alteraria o fenótipo encontrado em macrófagos. Adicionalmente, trabalhos anteriores do nosso grupo mostram que o uso de CM BAT e CM WAT provenientes de camundongos *Asc*^{-/-} e *Caspase 1-11*^{-/-} modulam o metabolismo lipídico, secreção de citocinas e viabilidade de células tumorais de mama e hepatocarcinomas. Ao cultivarmos BMDMs com CM derivados de *IL-18*^{-/-} e *Asc*^{-/-} mais uma vez não encontramos alterações na redução da liberação de TNF- α e recuperação

da viabilidade, ocorrendo o mesmo em comparação ao uso de meio condicionado de animais WT (Figura 45).

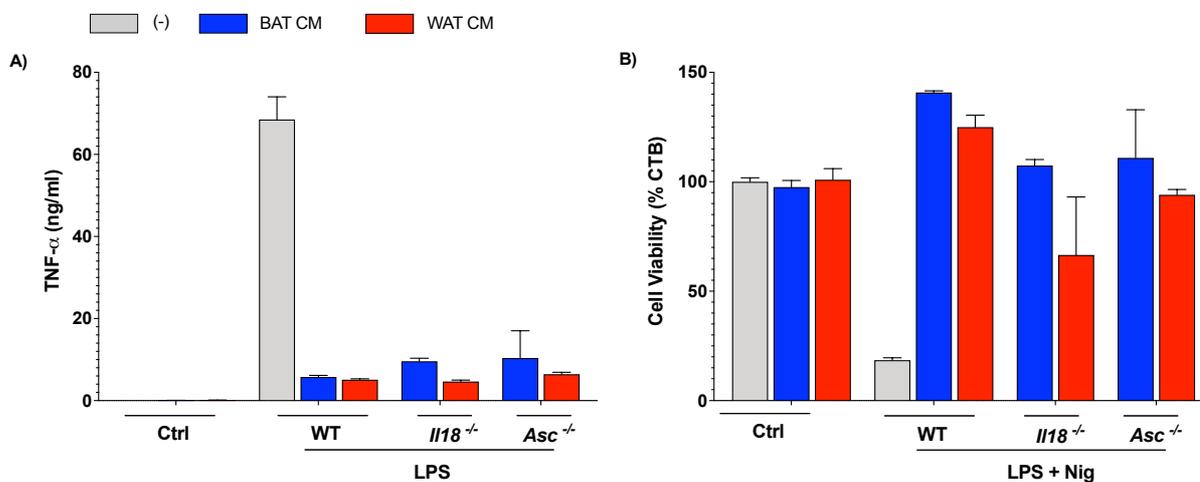


Figura 45 - Cultivo com meio condicionado derivado de animais *Asc*^{-/-} e *Il-18*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) proveniente de animais WT, *Asc*^{-/-} e *Il-18*^{-/-} por 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl); primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas, seguido de ativação do inflamassoma NLRP3 com nigericina (10 μM) por 1,5 horas. Quantificação de TNF-α (A) por HTRF. Ensaio de viabilidade celular (B). Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT não afeta o metabolismo energético mitocondrial em macrófagos tratados com LPS

Lauterbach e colaboradores mostram que em momentos iniciais da sinalização por TLRs macrófagos ativados com LPS apresentam aumento da taxa de acidificação extracelular e da respiração mitocondrial máxima (Lauterbach; Hanke; Serefidou *et al.*, 2019). Ao término das 3 horas de incubação com LPS submetemos os macrófagos pré cultivados com meio condicionado a análise de fluxo metabólico através de parâmetros glicolíticos e de respiração mitocondrial. A taxa de consumo de oxigênio é feita a partir da adição de três compostos, primeiro um inibidor da ATP sintase (oligomicina) que diminui o fluxo de elétrons da cadeia transportadora de elétrons (CTE). Com o objetivo de estimular o máximo da CTE, porém evitando a dissipação completa do potencial da membrana, o segundo composto adicionado é um agente desacoplador (FCCP). Por fim, os inibidores do complexo I e III da CTE, (rotenona e antimicina A respectivamente), são injetados simultaneamente afim de inibir completamente

a respiração mitocondrial, permitindo a avaliação da respiração não mitocondrial (Figura 25 dos métodos). Além da respiração máxima e consumo de oxigênio não mitocondrial, como já mencionados, o ensaio permite a avaliação da respiração basal, vazamento de prótons. Entretanto não houve alteração de nenhum desses parâmetros em macrófagos pré cultivados com CM BAT e WAT em relação ao controle somente com LPS (Figura 46).

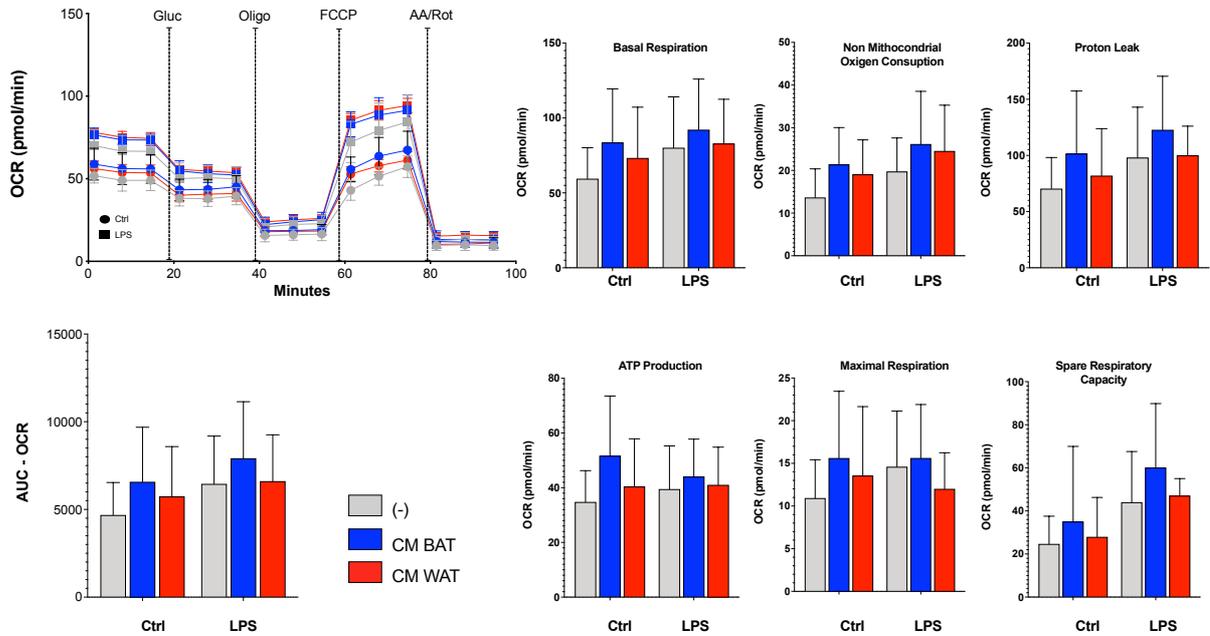


Figura 46 - **Taxa de consumo de oxigênio em BMDMs cultivados com meio condicionado.** BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e análises derivadas. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Para a análise de acidificação do meio extracelular, considera-se como as células respondem a injeção de glicose e oligomicina. Para esse caso a oligomicina bloqueia respiração mitocondrial forçando as células a dependerem da glicólise para produção de ATP (Figura 23). Com esse método é possível observar taxas de glicólise, acidificação não glicolítica, capacidade e reserva glicolítica. Mais uma vez, o cultivo com meio condicionado não alterou o fenótipo encontrado em relação ao controle com LPS (Figura 47).

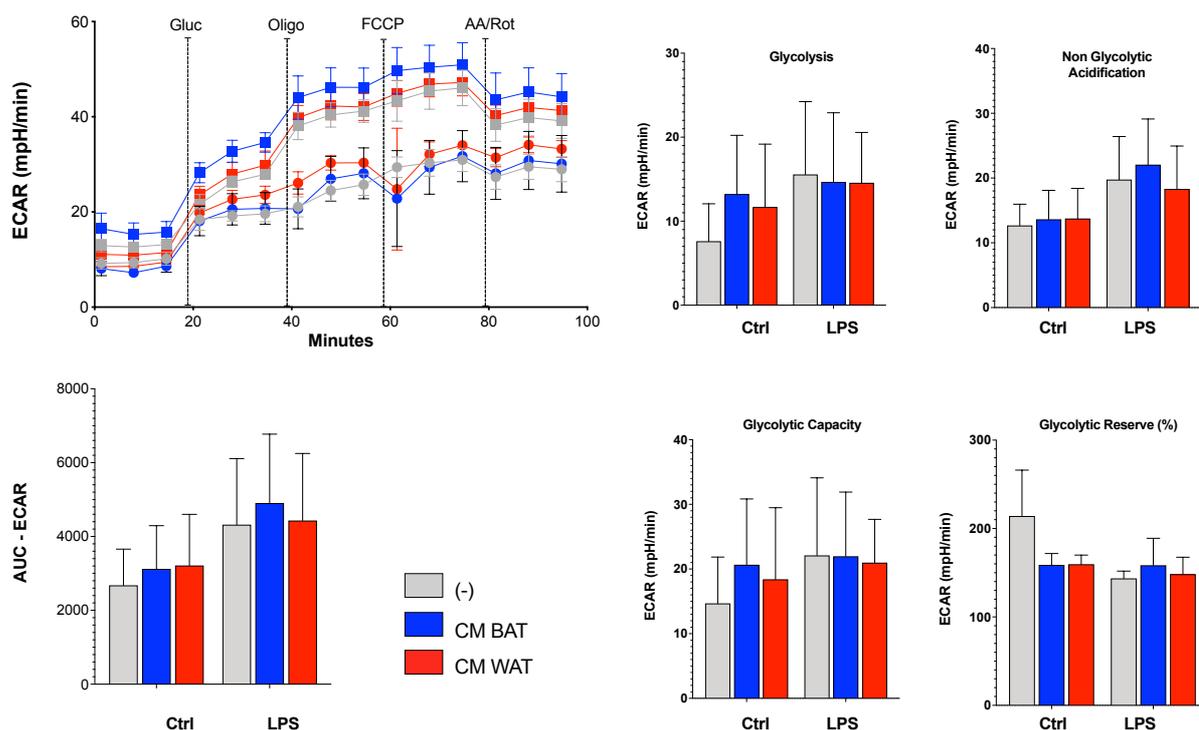


Figura 47- Taxa de acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação da de acidificação extracelular (ECAR) e análises derivadas. Gráficos representativos seleccionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Uma avaliação conjunta dos valores de OCR e ECAR permitem acessar o fenótipo e potencial metabólico celular. Como o cultivo com meio condicionado não induziu alterações no consumo de oxigênio e acidificação extracelular o perfil metabólico dos macrófagos se manteve dentro do mesmo padrão energético consequente da ativação por LPS (Figura 48).

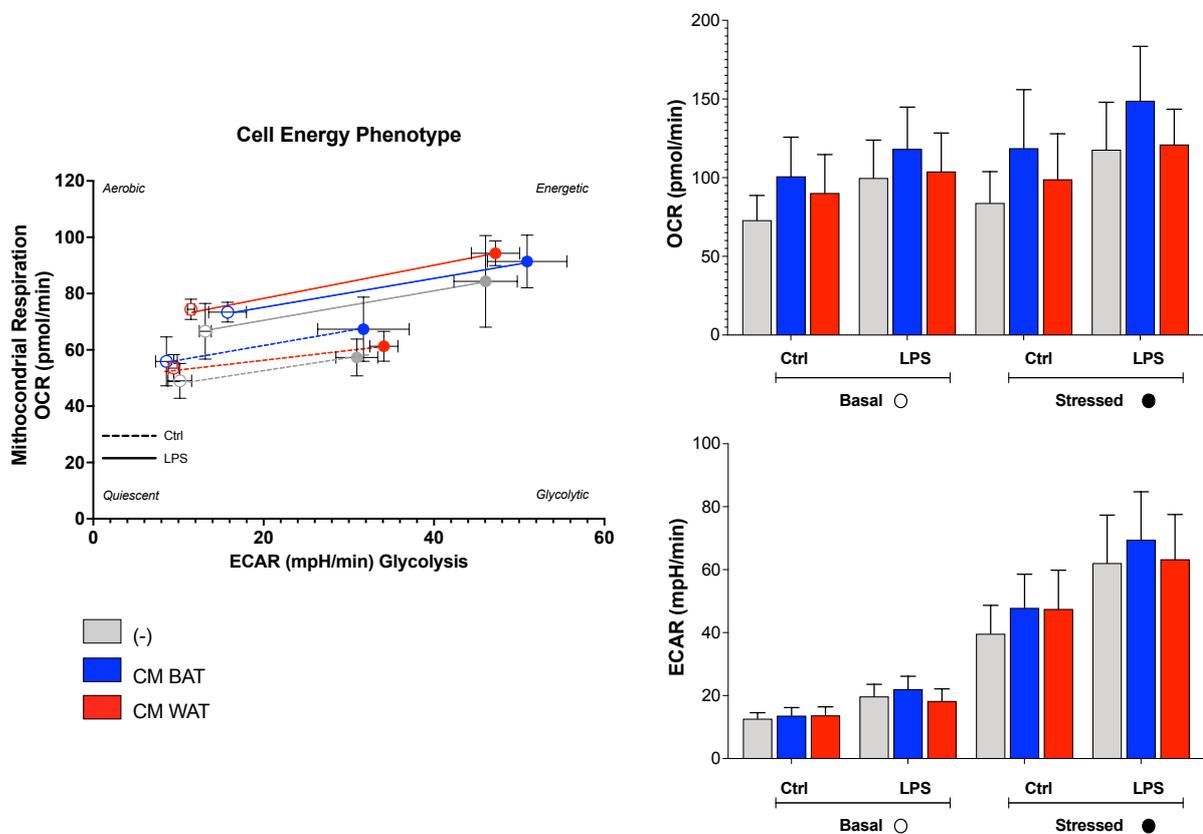


Figura 48- Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) 1 hora. Macrófagos foram: não tratados (Ctrl) ou primados com LPS (200ng/ml) por 3 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Gráfico de dispersão indicando modificações bioenergéticas geradas a partir da mensuração de OCR e ECAR em níveis basais e de estresse celular. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT induz diferentes modulação da expressão gênica em macrófagos

Anteriormente, observamos que o cultivo com o meio condicionado de ambos os tecidos pode induzir alterações muito semelhantes no perfil transcricional de macrófagos ativados com LPS. Todavia, é importante destacar os diferentes efeitos que o meio condicionado de cada tecido é capaz de induzir *per si*. Ao cruzarmos a lista de genes modulados por cada meio condicionado em relação a condição de controle basal, temos que apenas 288 genes foram igualmente modulados através do cultivo com ambos CM BAT e CM WAT. CM BAT foi capaz

de modular exclusivamente apenas 140 genes, contra 644 modulados por CM WAT (Figura 49).

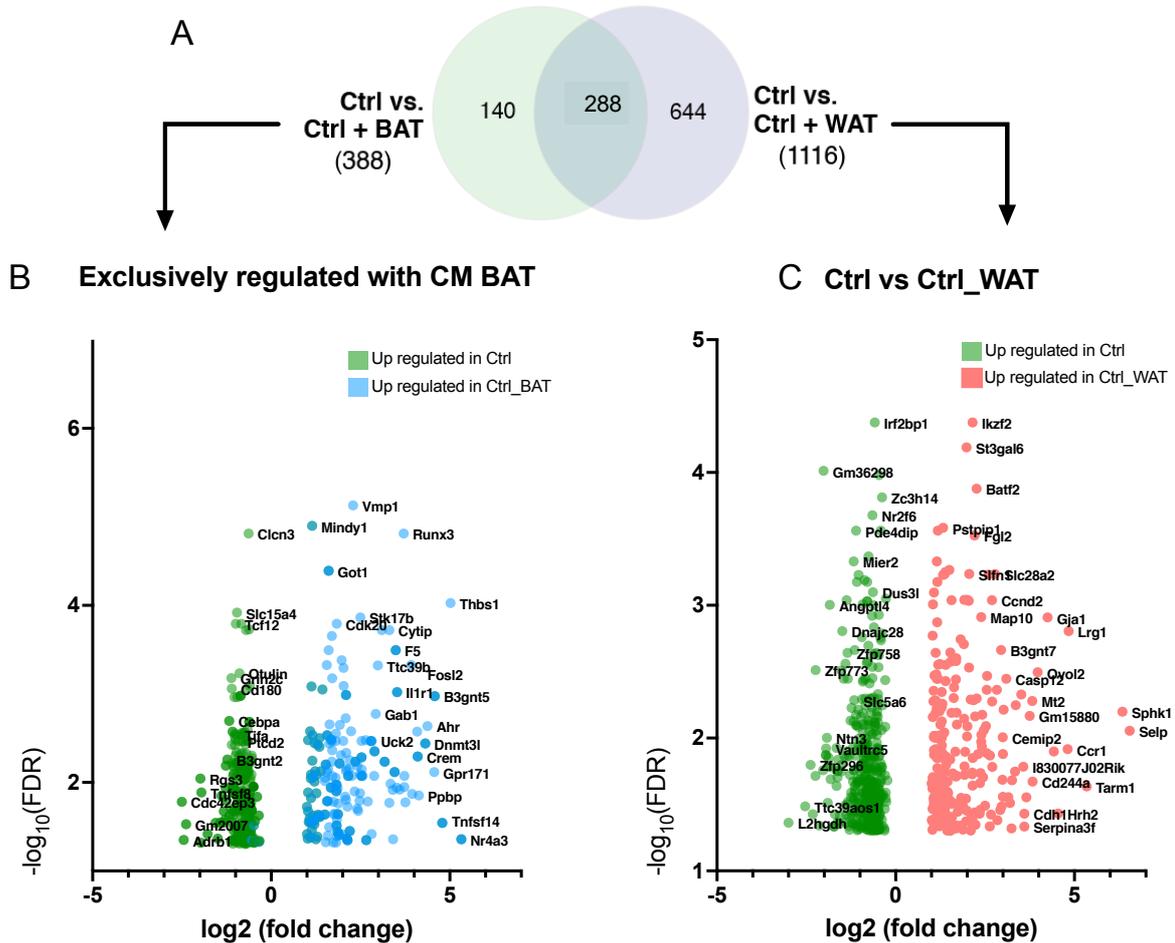


Figura 49 – **Diferenças entre DEGs modulados por cultivo com CM BAT e CM WAT na ausência de LPS.** A) Diagrama de Venn representando os números de DEGs, assim como sobreposições, a partir da comparação entre BMDMs com CM BAT ou CM WAT. B) Gráfico tipo vulcão de 140 DEGs modulados por CM BAT em relação a células controle e que não sejam modulados por CM WAT. C) Gráfico tipo vulcão de 644 DEGs modulados exclusivamente por CM WAT e não por CM BAT em relação à células controle. DEGs que mostraram mudanças nos níveis de expressão pelo menos ± 2 vezes foram identificados por One-Way ANOVA (P-valor $< 0,05$) entre os diferentes grupos testados.

Cultivo com meio condicionado proveniente de BAT e WAT por 24 horas afeta diferencialmente o metabolismo mitocondrial de macrófagos

Em nossas análises de ontologia genética temos que mesmo na ausência de LPS um alto número de genes regulados pode ser associado com processos metabólicos (Figura 39). Além disso, também observamos que o uso de CM WAT induz a modulação de um número muito maior de DEGs do que CM BAT. Considerando mais uma vez os resultados prévios do nosso

grupo com o uso de meio condicionado de animais *Asc*^{-/-} e *Caspase 1/11*^{-/-}, além dos diferentes efeitos que essas moléculas apresentam dentro da síndrome metabólica como discutido mais profundamente na parte I desse trabalho, utilizamos também meio condicionado derivado de diferentes animais *knocout*.

Anteriormente mostramos que BMDMs cultivados com meio condicionado de BAT e WAT por um total de 4 horas, porém na ausência de LPS, apresentavam taxas semelhantes de OCR e ECAR ao controle não estimulado. Porém, BMDMs cultivados com CM WAT por 24 horas apresentam aumento nas taxas de OCR e ECAR, conferindo outra vez um fenótipo metabólico mais energético aos macrófagos (Figuras 50 e 53). Para CM BAT, os valores de OCR permaneceram semelhantes aos valores de células não estimuladas, fazendo com que as medidas geradas inferidas a partir da fosforilação oxidativa, (produção de ATP, respiração basal, vazamento de prótons, consumo de oxigênio não mitocondrial, respiração máxima e reserva de capacidade respiratória), fosse menor do que comparada com CM WAT (Figura 51). Porém houve um aumento de ECAR, posicionando esses macrófagos em um perfil metabólico glicolítico que células do grupo controle (Figura 53), entretanto ainda com menores taxas de glicólise, capacidade glicolítica e acidificação não glicolítica. (Figura 52).

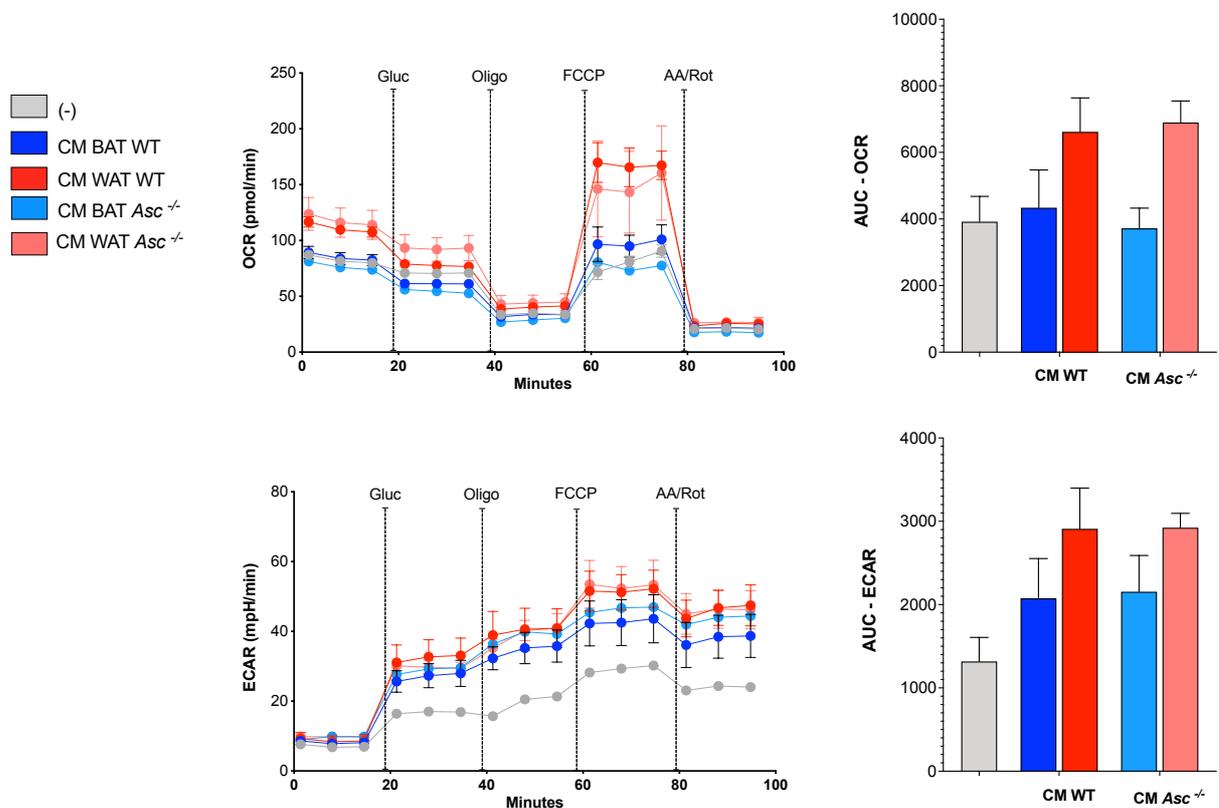


Figura 50 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Asc*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de

animais WT ou *Asc*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Representação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

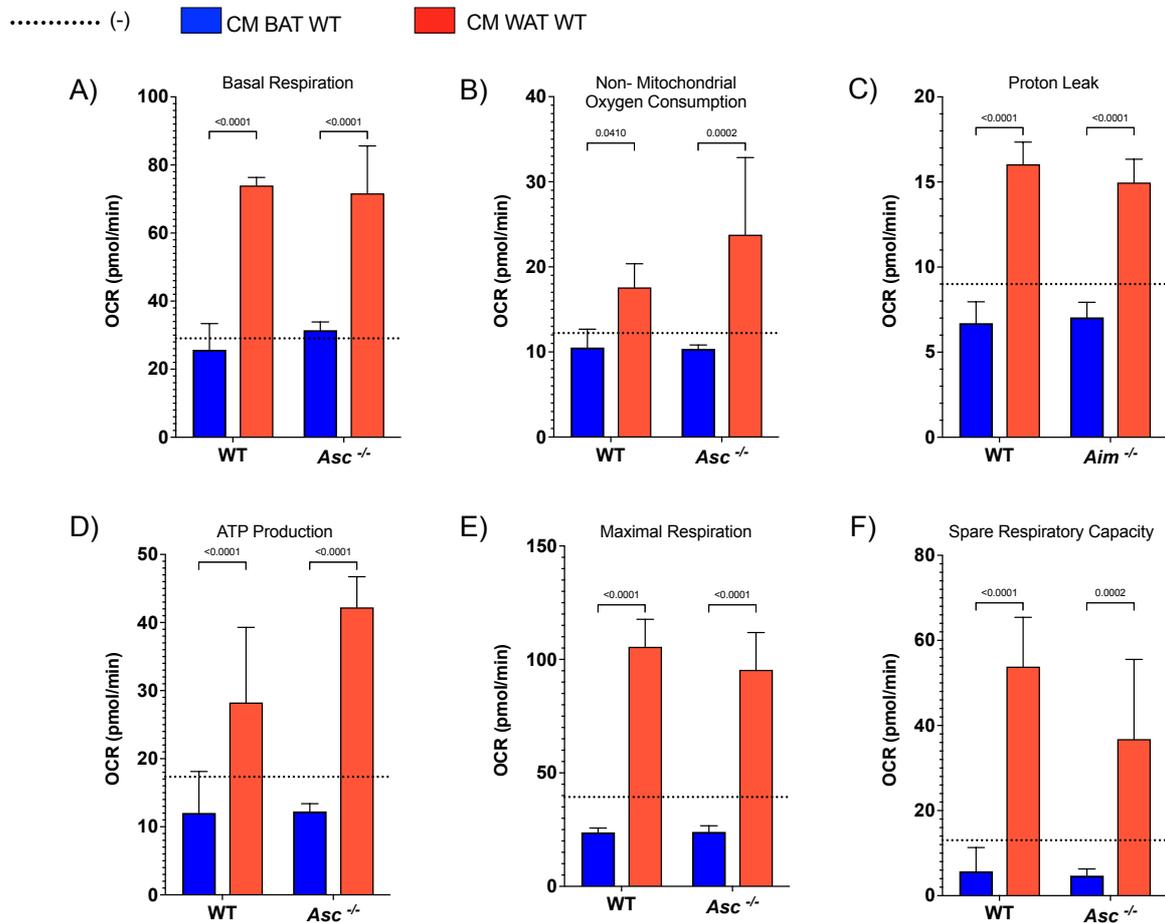


Figura 51 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Asc*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Asc*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade relacionados ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons inferidos a partir da taxa de consumo de oxigênio (OCR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

..... (-) ■ CM BAT WT ■ CM WAT WT

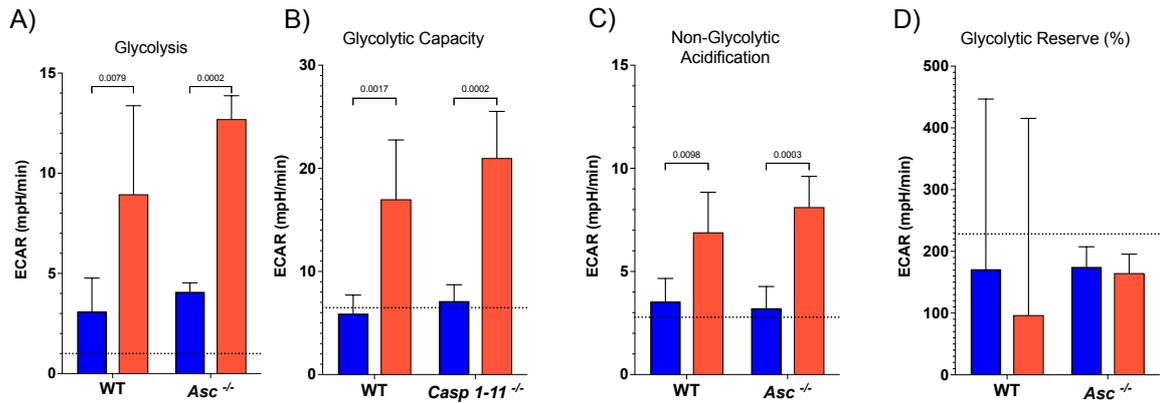


Figura 52 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Asc*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Asc*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade do metabolismo glicolítico inferidos a partir da taxa de acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

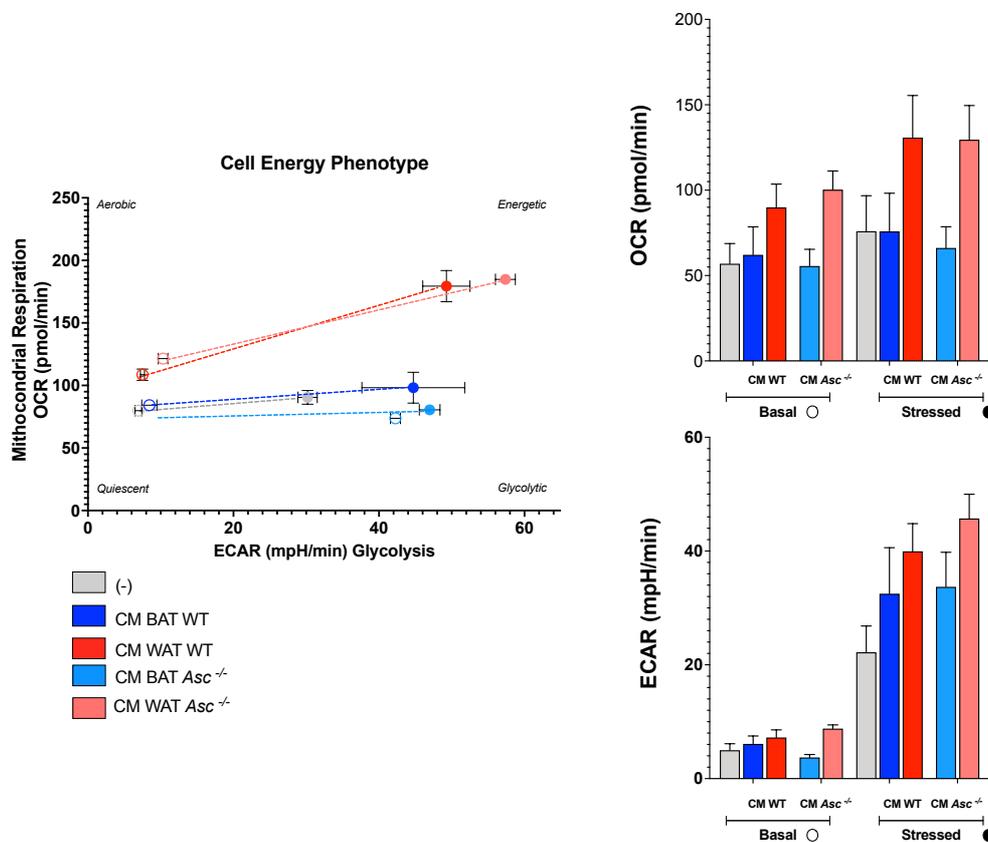


Figura 53 - Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Asc*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Asc*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*.

Gráfico de dispersão indicando modificações bioenergéticas geradas a partir da mensuração de OCR e ECAR em níveis basais e de estresse celular. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Sobre a diferença em se utilizar meio condicionado derivado de animais *knockout*, observamos que mais uma vez CM BAT e WAT derivado de *Asc*^{-/-} gera o mesmo efeito que CM de animais WT (Figura 50, 51, 52 e 53). Todavia, encontramos diferenças pontuais com o cultivo de CM BAT e WAT derivado de *Aim2*^{-/-} e *Caspase 1/11*^{-/-} ao longo da cinética dos ensaios (Figura 54 e 58).

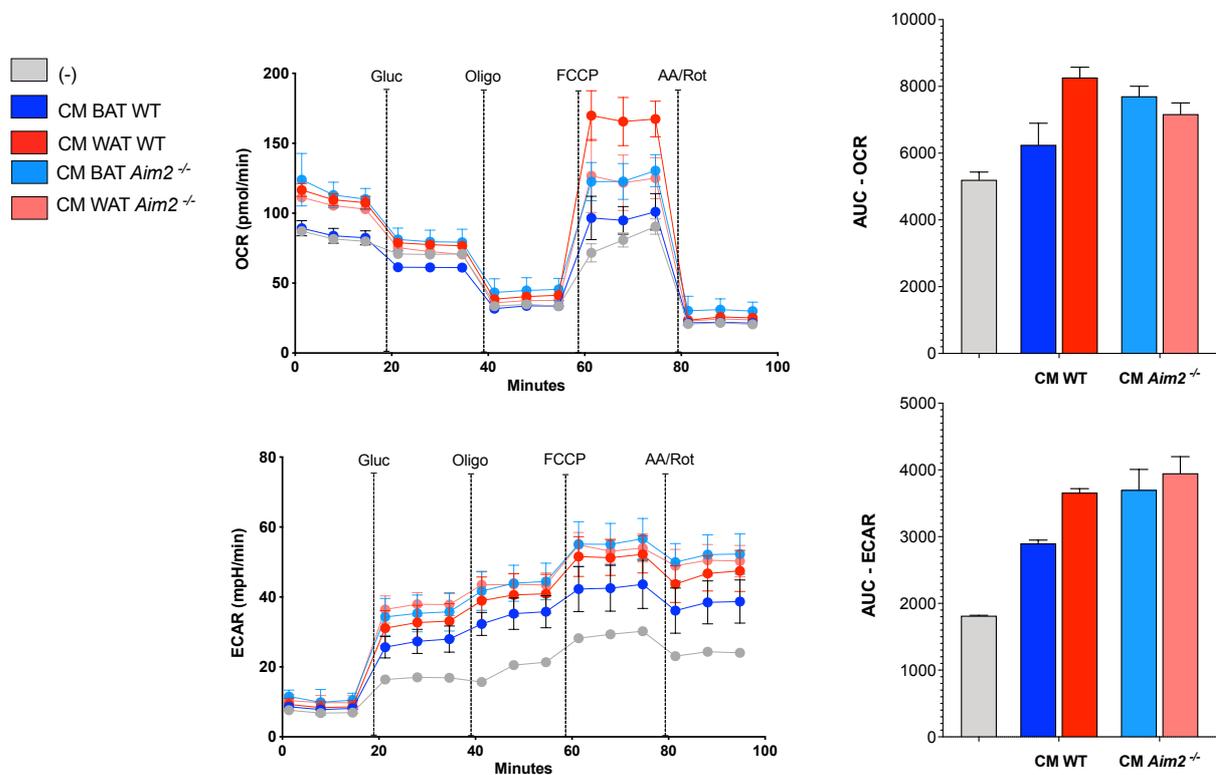


Figura 54 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Aim2*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Aim2*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

As alterações geradas nos níveis de OCR pelo cultivo com CM WAT de animais *Aim2*^{-/-} refletiram funcionalmente em um aumento da produção de ATP e diminuição da respiração máxima e capacidade de reserva respiratória de macrófagos (Figura 55 D, E e F). Não

encontramos alterações substanciais no perfil glicolítico pelo uso de CM WAT de animais *Aim2*^{-/-} (Figura 56). Observamos que CM BAT *Aim2*^{-/-} ter induziu aumento nas taxas de OCR e ECAR ao longo da cinética do ensaio em comparação a CM BAT WT (Figura 54). Apesar de isso contribuir para alteração no perfil bioenergético de macrófagos (Figura 57), não encontramos diferenças significativas para as medidas individuais de funcionalidade geradas (Figuras 55 e 56).

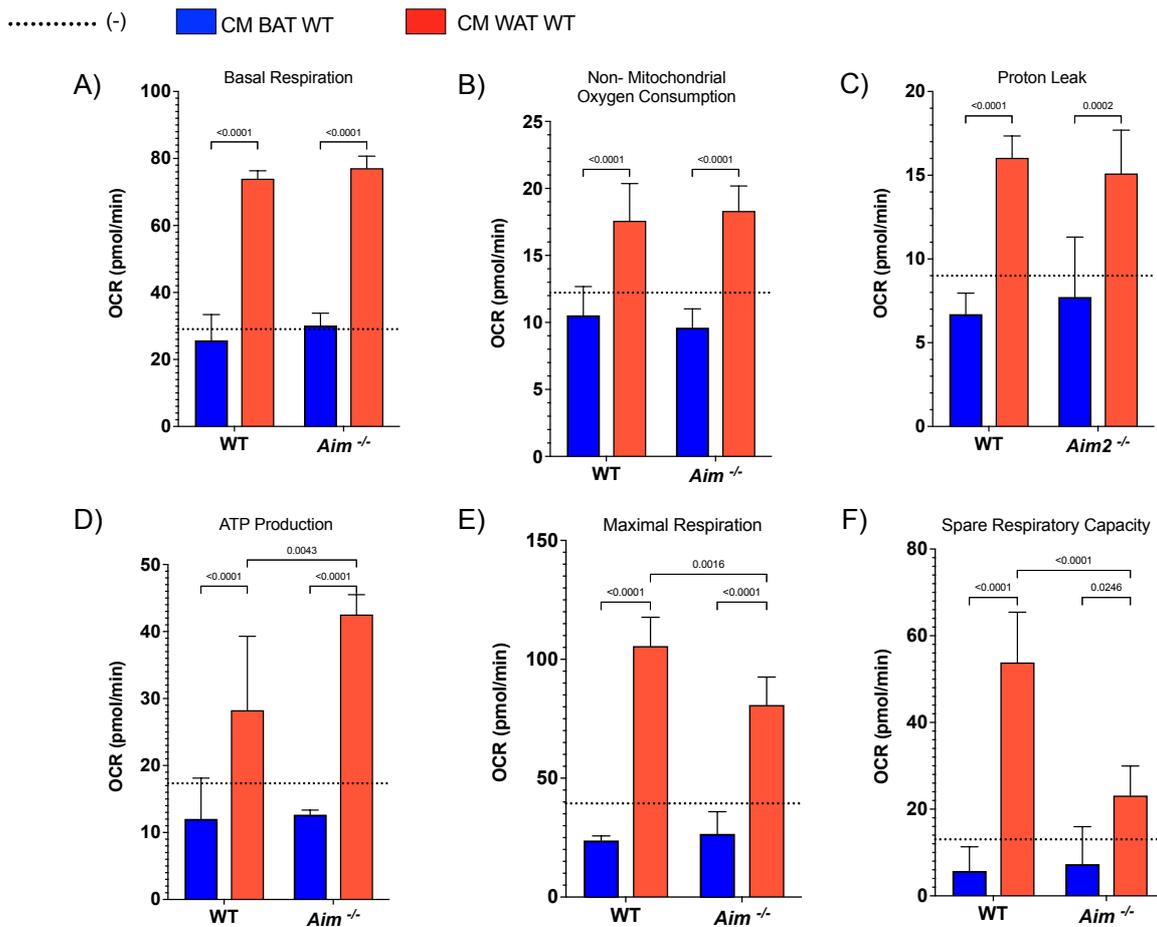


Figura 55 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Aim2*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Aim2*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade relacionados ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons inferidos a partir da taxa de consumo de oxigênio (OCR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

..... (-) ■ CM BAT WT ■ CM WAT WT

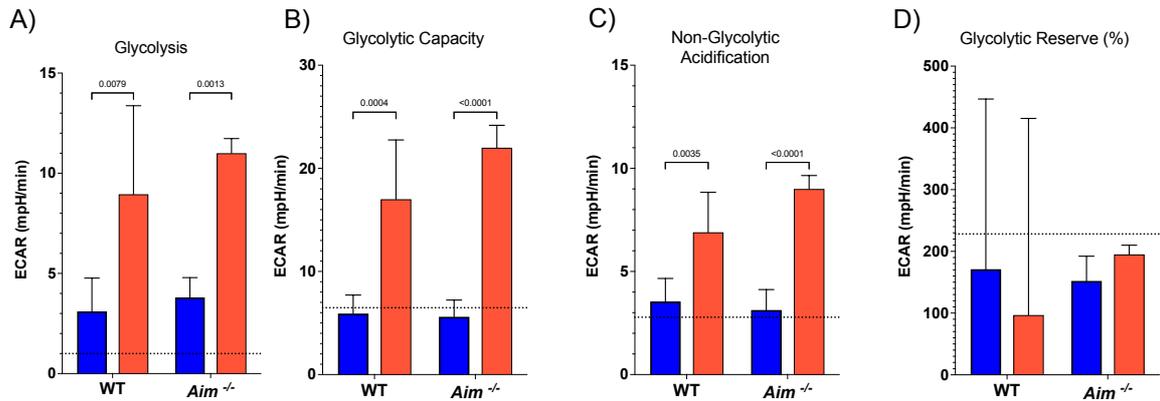


Figura 56 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Aim2*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Aim2*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade do metabolismo glicolítico inferidos a partir da taxa de acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

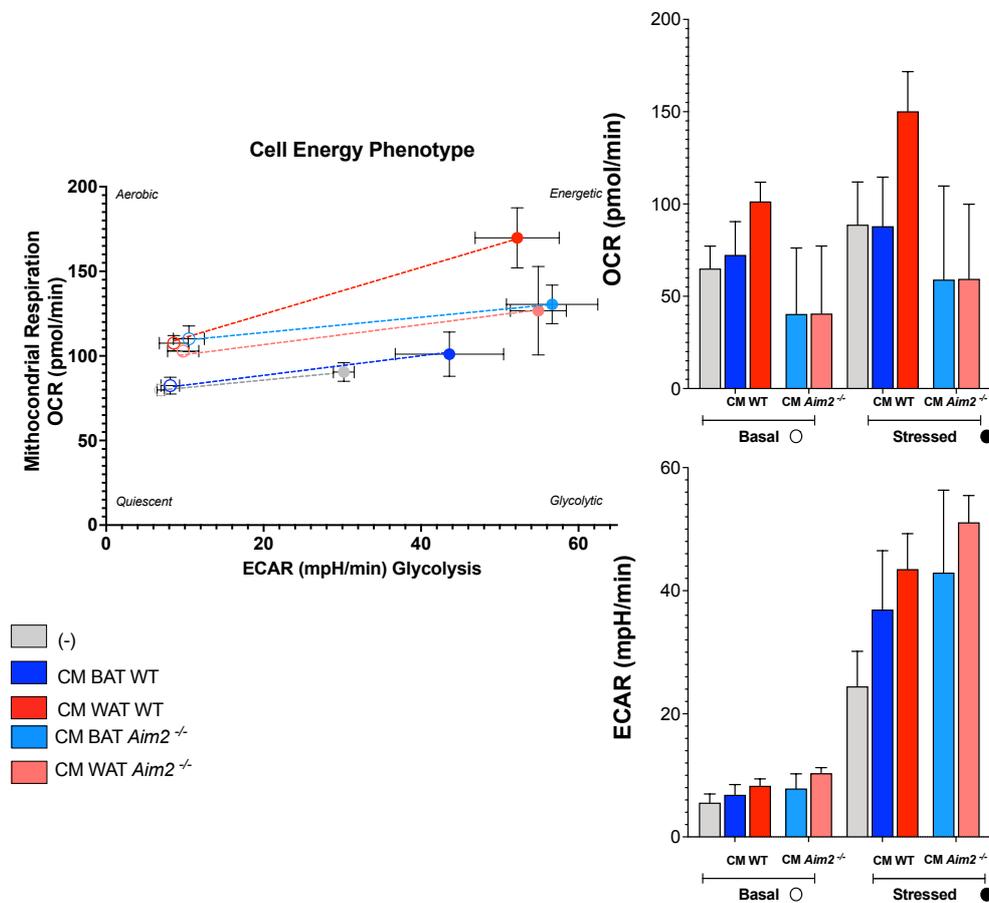


Figura 57- Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Aim2*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT

ou *Aim2*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Gráfico de dispersão indicando modificações bioenergéticas geradas a partir da mensuração de OCR e ECAR em níveis basais e de estresse celular. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

O cultivo com meio condicionado de animais *Caspase 1/11*^{-/-} gerou alterações muito semelhantes as encontradas com CM BAT ou WAT de animais *Aim2*^{-/-}. Mais uma vez, para CM WAT, encontramos diminuição nas taxas de OCR e ECAR (Figura 58). Essas alterações refletiram no perfil bioenergético (figura 61) e diretamente na produção de ATP e respiração máxima dos macrófagos (Figura 59). Novamente, não foram encontradas diferenças significativas para glicólise e capacidade glicolítica, apesar dos diferentes valores de ECAR (Figura 60). O cultivo com CM BAT não induziu nenhuma alteração dependente da ausência de caspase 1/11 em sua composição.

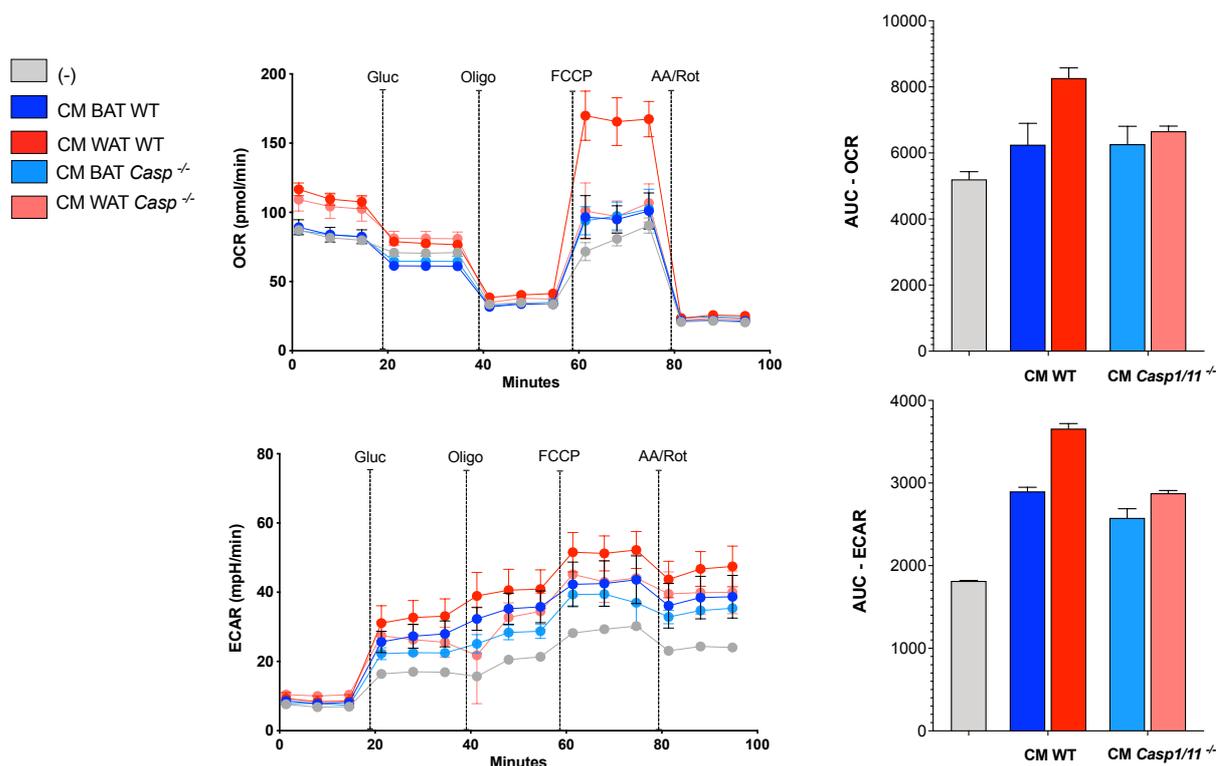


Figura 58 - Análise de fluxo extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Casp1-11*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Casp1/11*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

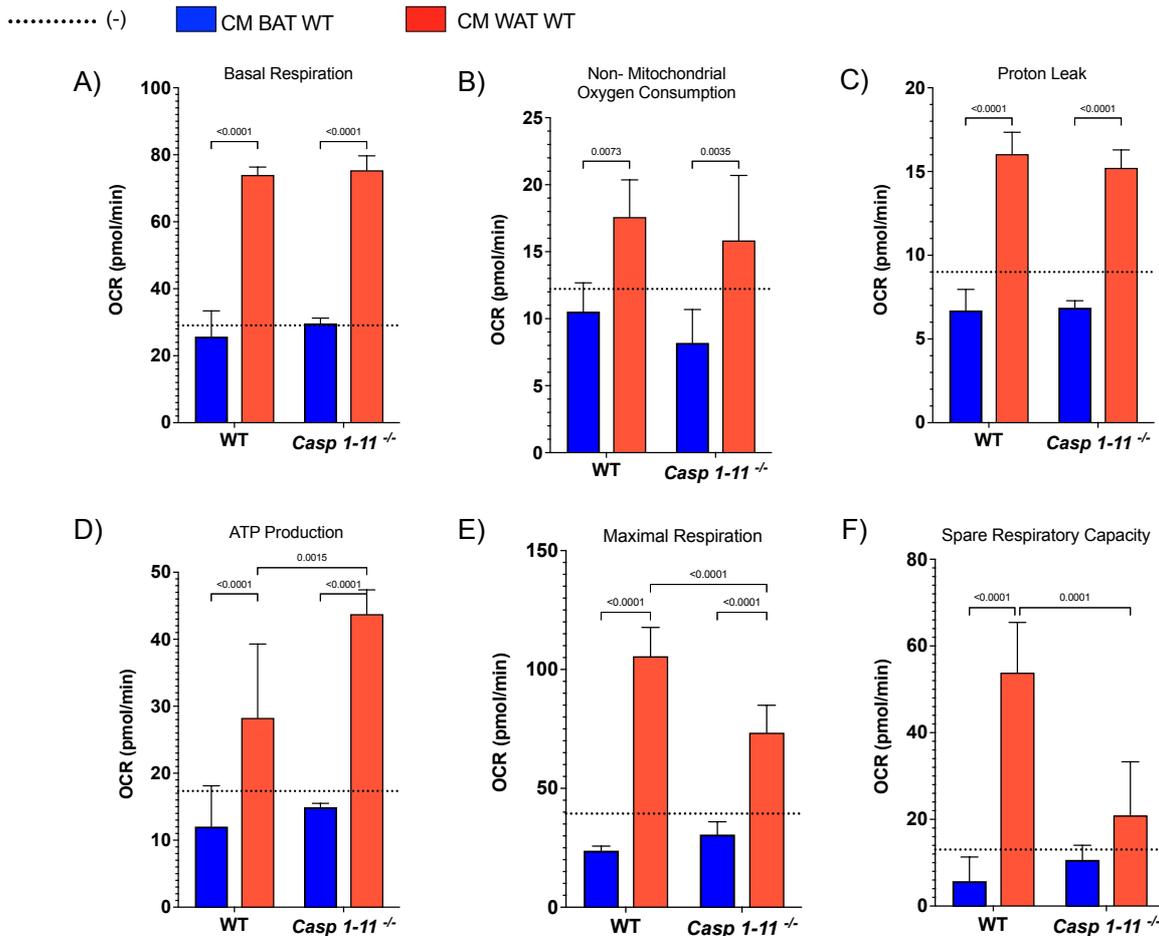


Figura 59 – Alterações geradas a partir da modulação da fosforilação oxidativa em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Casp 1/11*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Casp1/11*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalisador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade relacionados ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons inferidos a partir da taxa de consumo de oxigênio (OCR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

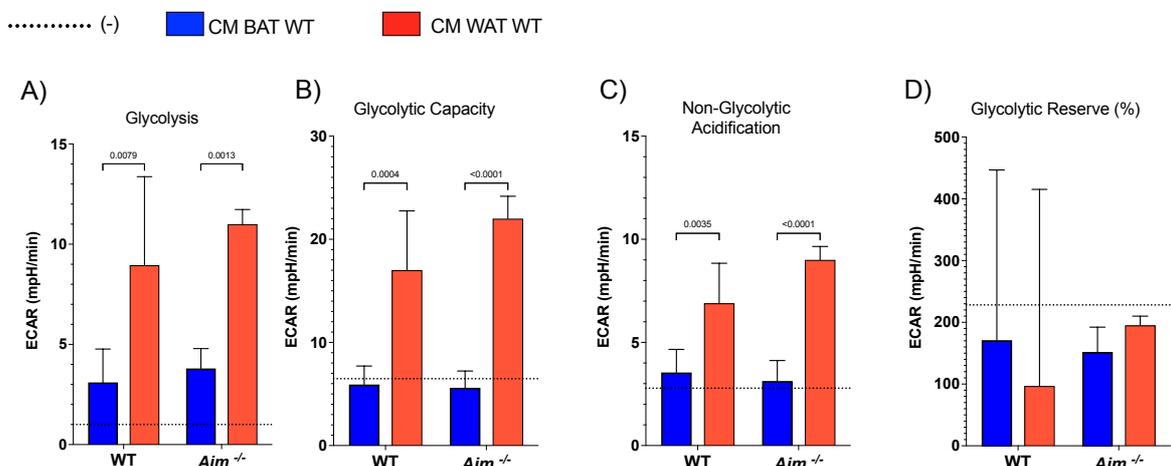


Figura 60 - Alterações geradas a partir da modulação da acidificação do meio extracelular em BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Casp 1/11*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou

presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Asc*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Representação de diferentes eventos de funcionalidade do metabolismo glicolítico inferidos a partir da taxa de acidificação extracelular (ECAR). Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

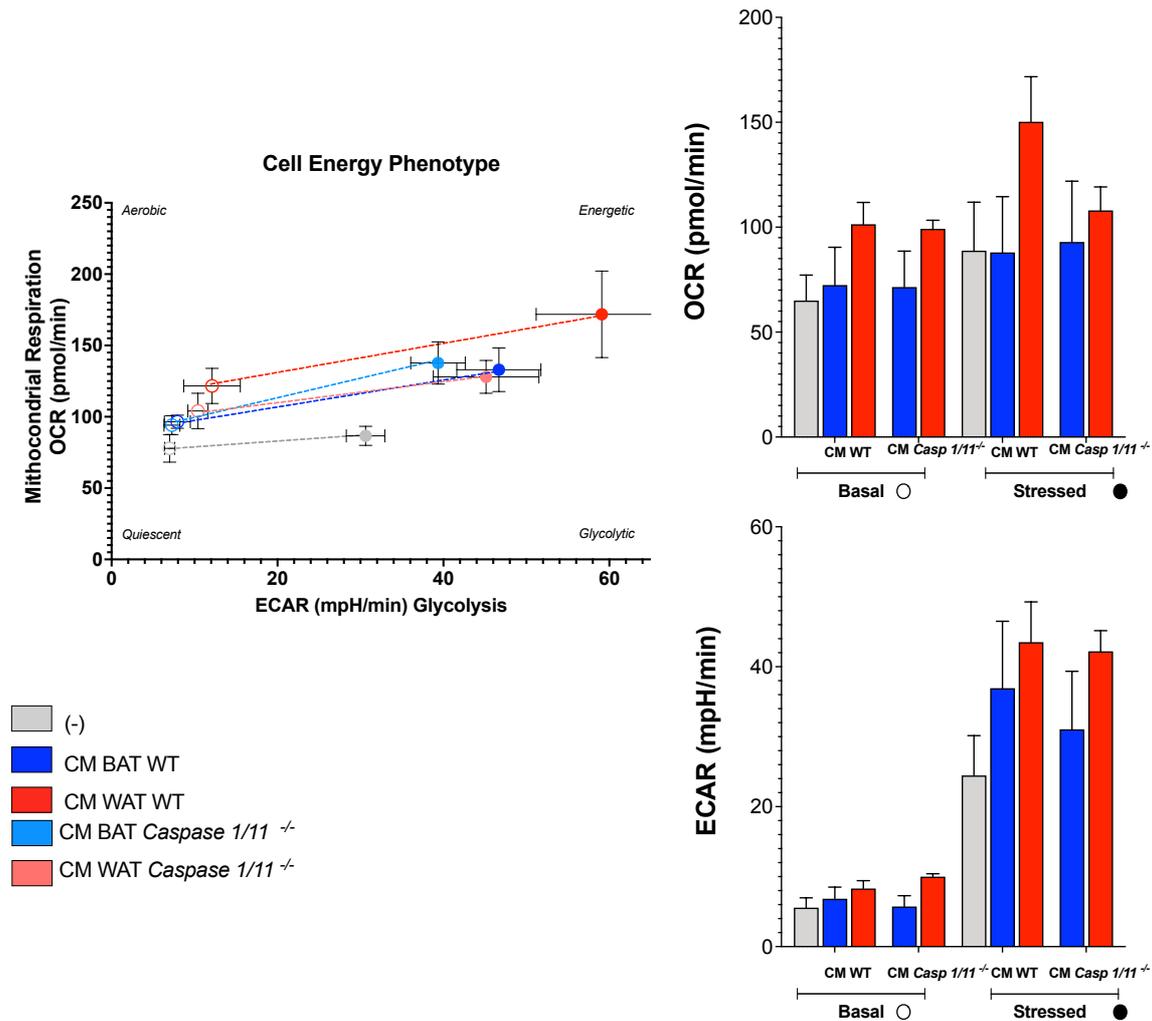


Figura 61 - Perfil energético de BMDMs cultivados com meio condicionado derivado de animais *Casp1-11*^{-/-}. BMDMs cultivados na ausência (-) ou presença de meio condicionado (BAT/WAT CM) derivados de animais WT ou *Casp1/11*^{-/-} por 24 horas e submetidos ao ensaio de análise de fluxo extracelular com o bioanalizador *Seahorse*. Gráfico de dispersão indicando modificações bioenergéticas geradas a partir da mensuração de OCR e ECAR em níveis basais e de estresse celular. Gráficos representativos selecionados a partir de um conjunto de experimentos independentes. Barras representam a média em conjunto com o erro padrão da média. Dados foram analisados com 2way ANOVA test, seguido de pós análise com Tukey's test com valores de p ajustados para teste de múltiplas comparações. Valores abaixo do limite de detecção do ensaio não foram considerados para análise de distribuição de normalidade dos dados.

Discussão/conclusões – capítulo II

Ter em mente a plasticidade do tecido adiposo em termos de composição e função auxilia no entendimento das razões pelas quais o estudo desse órgão endócrino ganha cada vez mais espaço. A comunicação entre adipócitos e macrófagos é objeto de interesse constante, onde se busca a compreensão dos mecanismos moleculares provenientes dessa interação em ambos os tipos celulares. Majoritariamente os estudos foca em como macrófagos residentes do tecido adiposo modulam a inflamação sistêmica em condições de disfunção metabólica (Cox; Crozet; Holtman *et al.*, 2021) (Castoldi; Naffah de Souza; Camara *et al.*, 2015) (Castoldi; Naffah de Souza; Camara *et al.*, 2015) . A segunda parte desse trabalho fez uso de uma abordagem *ex vivo* afim de examinar como produtos de secreção de tecidos adiposos branco e marrom afetariam a regulação da resposta inflamatória de macrófagos. Em macrófagos derivados de medula óssea não polarizados, mostramos que o contato com meio condicionado de AT é capaz de reduzir os efeitos pró-inflamatórios causados pela ativação do inflamassoma NLRP3. Mostramos que AT CM é capaz de reduzir as taxas de morte celular independente se o segundo sinal de ativação para NLRP3 é feito por nigericina ou ATP. Porém, AT CM não reduziu os danos consequentes da ativação de Aim2 e NLRC4.

Levando em conta que se adicionarmos o meio condicionado juntamente com a nigericina, ou seja depois que LPS já induziu a ativação de TLR4, e que em macrófagos onde a indução de *Asc speck* não necessitou do estímulo por LPS, não encontramos os fenótipos anteriormente descritos. Passamos a considerar que o efeito gerado por AT CM na diminuição da ativação de NLRP3 estaria associado ao primeiro sinal da cascada, o *priming*. De forma geral encontramos que tanto CM BAT quanto CM WAT induzem diminuição da resposta inflamatória clássica gerada pela ativação não só de TLR4 como também TLR1/2 ou TLR7/8. Nossos dados vão de acordo com variados achados da literatura onde o uso de meio condicionado de células mesenquimais de tecido adiposo ou sistemas de co-cultura entre adipócitos e macrófagos reduzem o perfil inflamatório. Nossos resultados demonstram que AT CM ao mesmo tempo em que reduz os níveis de TNF- α induz o aumento da secreção de IL-10, além dos níveis de expressão gênica apontarem para um perfil próximo ao encontrado em macrófagos M2. Souza-Moreira e colaboradores apresentam que meio condicionado de células mesenquimais de tecido adiposo é capaz de ativar os complexos mTORC1 e mTORC2 estimulando a biossíntese de corpúsculos lipídicos e polarização de macrófagos (Souza-Moreira; Soares; Dias *et al.*, 2019). Similarmente aos nossos dados eles demonstram que o cultivo com meio condicionado induz a fosforilação de AKT e propõe um mecanismo de

reprogramação do imunometabolismo pelo meio condicionado através da via AKT-mTOR-PPAR que culmina com o aumento da produção de IL-10 e proliferação celular. Bechor e colaboradores do mesmo modo trabalham com a ideia de meio condicionado derivado de tecido adiposo influenciarem a biogêneses de corpúsculos lipídicos pela manipulação da via da autofagia (Bechor; Nachmias; Elia *et al.*, 2017). Ainda não são completamente elucidados os mecanismos moleculares que conectam o recrutamento de macrófagos M2 com os processos de ativação termogênica no BAT. Buscando melhor entender essa interação, Cereijo e colaboradores demonstram que a adipocina CXCL14 é uma das responsáveis por esse processo (Cereijo; Gavaldà-Navarro; Cairó *et al.*, 2018). Dentre seus resultados eles mostram que o cultivo com meio condicionado de BAT em macrófagos de linhagem promove a migração de macrófagos M2 e reduz a de macrófagos M1. De forma similar ao que encontramos nesse trabalho, também demonstram que meio condicionado de tecido marrom promove aumento da expressão de *Arg1*.

Apesar de experimentos iniciais de caracterização do meio condicionado terem sido conduzidos, evidenciando por exemplo que a inativação por altas temperaturas ou tratamento com endonuclease não causam perda de efeito. Nesse trabalho não foi identificado qual fator ou fatores especificamente do meio condicionado seriam os responsáveis pela indução do fenótipo aqui descrito. Com isso não reduzimos diretamente o fato a algo “espécie exclusivo” e avaliamos o potencial anti-inflamatório do meio condicionado em macrófagos e monócitos humanos. Todavia, não houve redução da produção de citocinas pró-inflamatórias ou recuperação da viabilidade. Apesar da tentativa ainda assim reconhecemos as limitações do modelo e o ideal seria de fato o uso de meio condicionado proveniente de tecido adiposo humano. Vale ressaltar que existem trabalhos que já fizeram uso desse tipo de ferramenta, obtendo amostras de tecido adiposo branco a partir de pacientes que passaram por cirurgias de retirada de gordura abdominal. Em um interessante estudo indo de acordo com os achados do presente trabalho, Guillén e colaboradores mostram que meio condicionado derivado de células mesênquimais de tecido adiposo de pacientes não obesos medeiam processos anti-inflamatórios em monócitos humanos (Guillén; Platas; Pérez Del Caz *et al.*, 2018). Destacam-se os resultados que mostram redução de TNF- α e da ativação de NF κ B, bem como o aumento de IL-10.

Já abordamos anteriormente que as diferenças entre os tipos de tecidos adiposos vão muito além de serem apenas morfológicas e influenciam diretamente na funcionalidade de cada tecido (Richard; White; Elks *et al.*, 2000). Essas diferenças intrínsecas entre os diferentes tecidos resultam da origem de desenvolvimento do adipócito padrões de expressão gênica, capacidade secretória e atividade lipolítica. Os meios condicionados de ambos tecidos aqui

estudados induziram fenótipos semelhantes em BMDMs estimulados com LPS nos parâmetros anti-inflamatórios analisados. Apesar da análise de componente principal derivada dos dados de NGS também colocar os grupos CM BAT e CM WAT próximos fica evidente a diferença entre o número de genes diferencialmente expressos induzida pelos dois grupos. Na ausência de LPS comparando-se apenas com o controle de expressão basal, o uso de CM WAT induz expressão diferencial de 1116 genes enquanto CM BAT apenas 388. Essa diferença numérica reflete também os valores de *Enrichment Score* encontrados para os termos de análise de ontologia, onde para genes associados a processos metabólicos CM BAT apresenta 49.32 e CM WAT 84.55. Dowal e colaboradores apresentam que co-cultura de adipócitos marrons e macrófagos por si só já é capaz de alterar o perfil inflamatório de macrófagos independente da presença ou não de estímulo (Dowal; Parameswaran; Phat *et al.*, 2017). Curiosamente, observando nossos dados de agrupamento hierárquico de genes diferencialmente expressos nota-se que células controle sem estímulos se agrupam de forma mais próxima ao controle com apenas LPS do que os grupos com meio condicionado. Isso nos levou a crer que apesar de não termos encontrado um perfil diferencial durante as análises inflamatórias, em algum momento do metabolismo celular essa diferença se manifestaria para além do fenótipo transcricional.

Em BMDMs cultivados com CM por 24h e submetidos a análise de fluxo extracelular vimos que o cultivo com CM WAT instaura um perfil muito mais energético (maiores valores de OCR e ECAR) em relação as células controle e o cultivo com CM BAT. Em macrófagos residentes do tecido adiposo já foi estabelecido que o contato com diferentes formas de OxPL (*oxidized phospholipids*) em tecidos magros ou obesos alteram seu perfil bioenergético. Onde OxPL truncadas induzem a expressão de genes antioxidantes e um metabolismo quiescente ao contrário da forma de comprimento total (Serbulea; Upchurch; Schappe *et al.*, 2018). Adicionalmente, CM WAT derivado de animais *Aim*^{-/-} e *Caspase 1-11*^{-/-} apresentam variações nos perfis energéticos em relação ao que encontramos com animais WT. Sendo as principais diferenças voltadas para o aumento do consumo de ATP e diminuição da capacidade respiratória máxima. Como discutido na primeira parte desse trabalho, animais *Aim*^{-/-} e *Caspase 1-11*^{-/-} apresentam diferente desenvolvimento de síndromes metabólicas quando submetidos a dietas para aumento de peso. Muito provavelmente essas alterações, que são acentuadas pela ingestão diferenciada, em níveis basais podem diretamente alterar a morfologia o perfil de secreção do tecido adiposo desses animais, como ocorre para o modelo *Il-18*^{-/-}. Naturalmente, apenas com uma caracterização completa da composição dos diferentes meios condicionados, seja devido aos diferentes tecidos ou genótipos, é necessária para melhor esclarecer as diferentes modulações de perfil energético.

Conclusões

Imunometabolismo é um campo de estudo que ganhou um imenso destaque nas últimas décadas se consolidando com uma grande área de concentração de pesquisas translacionais. Processos metabólicos participam na regulação de mecanismos associados a resposta imune do indivíduo tanto durante um estado de homeostase como de desregulação. Investigar como a ativação dos inflamassomas e os processos celulares do tecido adiposo se conectam constitui uma das áreas de atuação que gera ainda muitas perguntas nesse campo.

No presente trabalho avaliamos duas faces possíveis dessa relação, durante um estado de desordem metabólica na primeira parte, e uma segunda parte focada na resolução do processo inflamatório e reestabelecimento da homeostase. Mostramos que em um modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica, a ausência da proteína adaptadora ASC modifica a resposta metabólica de camundongos de modo que:

- Animais *Asc*^{-/-} apresentaram maior ganho de peso e acúmulo de gordura abdominal;
- Alterações morfológicas induzidas por HFD foram mais expressivas no BAT, além de modulação diferencial de *Pgc1a*, de animais KO;
- Menores níveis de expressão gênica de *Acly* e *Ctpla* no WAT e fígado foram encontrados em animais *Asc*^{-/-};
- Animais *Asc*^{-/-} apresentaram maiores níveis de esteatose hepática em relação aos animais WT, além de elevados níveis dos indicadores de mal função renal e hepática
- Apesar de maiores indícios de esteatose, animais *Asc*^{-/-} apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias no fígado durante dieta hiperlipídica.

Durante a segunda parte, investigamos como fatores secretados pelo tecido adiposo poderiam influenciar a resposta de macrófagos frente a ativação do inflamassoma NLRP3. A partir do uso de meio condicionado concluímos que esses fatores contribuem com a diminuição da resposta inflamatória e reestabelecimento da homeostase através de:

- Cultivo com CM BAT e WAT reduziu os efeitos pró-inflamatórios causados pela ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos;

- Macrófagos pré-cultivados com CM BAT e WAT apresentaram recuperação da viabilidade celular comparados com macrófagos sem o pré-cultivo;
- CM BAT e WAT promovem alterações na expressão gênica global de macrófagos levando a um perfil anti-inflamatório frente ativação de diferentes TLRs;
- Uma maior quantidade de genes tem sua expressão alterada por CM WAT do que por CM BAT;
- O cultivo com CM WAT por 24 horas leva a alterações no metabolismo mitocondrial com elevados níveis de OCR e ECAR quando comparado a células não estimuladas ou estimuladas com CM BAT;
- Modificações fosforilação oxidativa induzida por CM-WAT em macrófagos é parcialmente dependente da presença de *Aim 2*^{-/-} e *Caspase 1-11*^{-/-} no meio condicionado. Gerando um aumento da produção de ATP e diminuição da respiração máxima.
- Ausência de *Aim 2* em CM-BAT provoca um aumento da acidificação do meio extracelular em macrófagos.

Referências Bibliográficas

AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. **Mol Endocrinol**, 22, n. 5, p. 1023-1031, May 2008.

AHL, S.; GUENTHER, M.; ZHAO, S.; JAMES, R. *et al.* Adiponectin Levels Differentiate Metabolically Healthy vs Unhealthy Among Obese and Nonobese White Individuals. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 100, n. 11, p. 4172-4180, 2015.

ALLIGIER, M.; MEUGNIER, E.; DEBARD, C.; LAMBERT-PORCHERON, S. *et al.* Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, 97, n. 2, p. E183-192, Feb 2012.

ALVES, L. A.; DE MELO REIS, R. A.; DE SOUZA, C. A.; DE FREITAS, M. S. *et al.* The P2X7 receptor: shifting from a low- to a high-conductance channel - an enigmatic phenomenon? **Biochim Biophys Acta**, 1838, n. 10, p. 2578-2587, Oct 2014.

ANAND, P. K. Lipids, inflammasomes, metabolism, and disease. **Immunol Rev**, 297, n. 1, p. 108-122, Sep 2020.

BAKER, M.; GAUKRODGER, N.; MAYOSI, B. M.; IMRIE, H. *et al.* Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study. **Diabetes**, 54, n. 8, p. 2492-2496, Aug 2005.

BECHOR, S.; NACHMIAS, D.; ELIA, N.; HAIM, Y. *et al.* Adipose tissue conditioned media support macrophage lipid-droplet biogenesis by interfering with autophagic flux. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, 1862, n. 9, p. 1001-1012, Sep 2017.

BISGAARD, L. S.; MOGENSEN, C. K.; ROSENDAHL, A.; CUCAK, H. *et al.* Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression – implications for atherosclerosis research. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 35234, 2016/10/13 2016.

BLACK, B. L.; CROOM, J.; EISEN, E. J.; PETRO, A. E. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. **Metabolism**, 47, n. 11, p. 1354-1359, Nov 1998.

BLÜHER, M. The distinction of metabolically ‘healthy’ from ‘unhealthy’ obese individuals. **Current Opinion in Lipidology**, 21, n. 1, p. 38-43, 2010.

BODEN, G.; CHEN, X.; MOZZOLI, M.; RYAN, I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, 81, n. 9, p. 3419-3423, Sep 1996.

BROZ, P.; PELEGRIN, P.; SHAO, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 3, p. 143-157, Mar 2020.

BROZ, P.; VON MOLTKE, J.; JONES, J. W.; VANCE, R. E. *et al.* Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. **Cell Host Microbe**, 8, n. 6, p. 471-483, Dec 16 2010.

BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. **Annu Rev Immunol**, 33, p. 257-290, 2015.

BRUNNER, J. S.; VOGEL, A.; LERCHER, A.; CALDERA, M. *et al.* The PI3K pathway preserves metabolic health through MARCO-dependent lipid uptake by adipose tissue macrophages. **Nat Metab**, 2, n. 12, p. 1427-1442, Dec 2020.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CASTOLDI, A.; NAFFAH DE SOUZA, C.; CAMARA, N. O.; MORAES-VIEIRA, P. M. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Front Immunol**, 6, p. 637, 2015.

CEREIJO, R.; GAVALDÀ-NAVARRO, A.; CAIRÓ, M.; QUESADA-LÓPEZ, T. *et al.* CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. **Cell Metab**, 28, n. 5, p. 750-763.e756, Nov 6 2018.

CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. **Front Cardiovasc Med**, 7, p. 22, 2020.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, Feb 2010.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; KIM, J. I. *et al.* Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 7, p. 30, 2016.

CHRISTGEN, S.; PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. **Cell Res**, 30, n. 4, p. 315-327, Apr 2020.

CHURCH, C. D.; BERRY, R.; RODEHEFFER, M. S. Isolation and study of adipocyte precursors. **Methods Enzymol**, 537, p. 31-46, 2014.

CHUSYD, D. E.; WANG, D.; HUFFMAN, D. M.; NAGY, T. R. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Frontiers in nutrition**, 3, p. 10-10, 2016.

CINTI, S. Pink Adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 29, n. 9, p. 651-666, 2018/09/01/ 2018.

COX, N.; CROZET, L.; HOLTMAN, I. R.; LOYHER, P. L. *et al.* Diet-regulated production of PDGF β by macrophages controls energy storage. **Science**, 373, n. 6550, Jul 2 2021.

DE OLIVEIRA, M. F. A.; TALVANI, A.; ROCHA-VIEIRA, E. IL-33 in obesity: where do we go from here? **Inflammation Research**, 68, n. 3, p. 185-194, 2019/03/01 2019.

DE SOUZA BATISTA, C. M.; YANG, R. Z.; LEE, M. J.; GLYNN, N. M. *et al.* Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. **Diabetes**, 56, n. 6, p. 1655-1661, Jun 2007.

DESHMUKH, A. S.; PEIJS, L.; BEAUDRY, J. L.; JESPERSEN, N. Z. *et al.* Proteomics-Based Comparative Mapping of the Secretomes of Human Brown and White Adipocytes Reveals EPDR1 as a Novel Adipokine. **Cell Metabolism**, 30, n. 5, p. 963-975.e967, 2019/11/05/ 2019.

DEUTSCH, A.; FENG, D.; PESSIN, J. E.; SHINODA, K. The Impact of Single-Cell Genomics on Adipose Tissue Research. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, n. 13, p. 4773, 2020.

DHINGRA, S.; BAGCHI, A. K.; LUDKE, A. L.; SHARMA, A. K. *et al.* Akt regulates IL-10 mediated suppression of TNF α -induced cardiomyocyte apoptosis by upregulating Stat3 phosphorylation. **PLoS one**, 6, n. 9, p. e25009-e25009, 2011.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, 27, p. 519-550, 2009.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev**, 281, n. 1, p. 8-27, Jan 2018.

DIXON, L. J.; FLASK, C. A.; PAPOUCHADO, B. G.; FELDSTEIN, A. E. *et al.* Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. **PLoS One**, 8, n. 2, p. e56100, 2013.

DOWAL, L.; PARAMESWARAN, P.; PHAT, S.; AKELLA, S. *et al.* Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses. **Mediators Inflamm**, 2017, p. 9067049, 2017.

ELINAV, E.; STROWIG, T.; KAU, A. L.; HENAO-MEJIA, J. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, 145, n. 5, p. 745-757, May 27 2011.

FEDORENKO, A.; LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. **Cell**, 151, n. 2, p. 400-413, 2012.

FELDMAN, A. T.; WOLFE, D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. **Methods Mol Biol**, 1180, p. 31-43, 2014.

FERNANDES-ALNEMRI, T.; YU, J. W.; DATTA, P.; WU, J. *et al.* AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, 458, n. 7237, p. 509-513, Mar 26 2009.

FERNANDEZ, S.; VIOLA, J. M.; TORRES, A.; WALLACE, M. *et al.* Adipocyte ACLY Facilitates Dietary Carbohydrate Handling to Maintain Metabolic Homeostasis in Females. **Cell Rep**, 27, n. 9, p. 2772-2784 e2776, May 28 2019.

FIORENZA, C. G.; CHOU, S. H.; MANTZOROS, C. S. Lipodystrophy: pathophysiology and advances in treatment. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 3, p. 137-150, Mar 2011.

FRANKLIN, B. S.; BOSSALLER, L.; DE NARDO, D.; RATTER, J. M. *et al.* The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. **Nat Immunol**, 15, n. 8, p. 727-737, Aug 2014.

FRANKLIN, B. S.; LATZ, E.; SCHMIDT, F. I. The intra- and extracellular functions of ASC specks. **Immunol Rev**, 281, n. 1, p. 74-87, Jan 2018.

FURMAN, D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E.; CARRERA-BASTOS, P. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nat Med**, 25, n. 12, p. 1822-1832, Dec 2019.

GAIDT, M. M.; HORNING, V. Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. **Curr Opin Immunol**, 44, p. 7-13, Feb 2017.

GESSNER, C.; RONDELET, G.; BELON, P.; FROSCHAUER, C. **Conradi Gesneri ... Historiae animalium lib. I[-III]**. Tigvri: apvd Christ. Froshoverum, 1551.

GIORDANO, A.; MURANO, I.; MONDINI, E.; PERUGINI, J. *et al.* Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. **J Lipid Res**, 54, n. 9, p. 2423-2436, Sep 2013.

GIORDANO, A.; SMORLESI, A.; FRONTINI, A.; BARBATELLI, G. *et al.* White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. **Eur J Endocrinol**, 170, n. 5, p. R159-171, May 2014.

GONG, Z.; ZHANG, X.; SU, K.; JIANG, R. *et al.* Deficiency in AIM2 induces inflammation and adipogenesis in white adipose tissue leading to obesity and insulin resistance. **Diabetologia**, 62, n. 12, p. 2325-2339, Dec 2019.

GUILLÉN, M. I.; PLATAS, J.; PÉREZ DEL CAZ, M. D.; MIRABET, V. *et al.* Paracrine Anti-inflammatory Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Human Monocytes. **Frontiers in physiology**, 9, p. 661-661, 2018.

HALBERG, N.; KHAN, T.; TRUJILLO, M. E.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 α ; Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. **Molecular and Cellular Biology**, 29, n. 16, p. 4467-4483, 2009.

HAMMARSTEDT, A.; JANSSON, P. A.; WESSLAU, C.; YANG, X. *et al.* Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, 301, n. 2, p. 578-582, Feb 7 2003.

HAN, M. S.; WHITE, A.; PERRY, R. J.; CAMPOREZ, J. P. *et al.* Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117, n. 6, p. 2751-2760, Feb 11 2020.

HASSALL, A. Observations on the development of the fat vesicle. 1849. **Obes Res**, 1, n. 5, p. 419-420, Sep 1993.

- HEID, M. E.; KEYEL, P. A.; KAMGA, C.; SHIVA, S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. **J Immunol**, 191, n. 10, p. 5230-5238, Nov 15 2013.
- HO, E.; SHIMADA, Y. Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. **Dev Biol**, 66, n. 2, p. 579-585, Oct 1978.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993.
- HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol Chem**, 271, n. 18, p. 10697-10703, May 3 1996.
- INDULEKHA, K.; SURENDAR, J.; ANJANA, R. M.; GEETHA, L. *et al.* Metabolic obesity, adipocytokines, and inflammatory markers in Asian Indians--CURES-124. **Diabetes Technol Ther**, 17, n. 2, p. 134-141, Feb 2015.
- JANEWAY, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 54 Pt 1, p. 1-13, 1989.
- JANEWAY, C. A., Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, 20, p. 197-216, 2002.
- JIANG, F.; LIM, H. K.; MORRIS, M. J.; PRIOR, L. *et al.* Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. **Redox Rep**, 16, n. 6, p. 223-229, 2011.
- JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W. *et al.* Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. **PLoS Comput Biol**, 5, n. 3, p. e1000324, Mar 2009.
- JONES, J. W.; KAYAGAKI, N.; BROZ, P.; HENRY, T. *et al.* Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 21, p. 9771-9776, May 25 2010.
- KANG, J. Y.; NAN, X.; JIN, M. S.; YOUN, S. J. *et al.* Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. **Immunity**, 31, n. 6, p. 873-884, Dec 18 2009.
- KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, 479, n. 7371, p. 117-121, Oct 16 2011.
- KAYAGAKI, N.; WONG, M. T.; STOWE, I. B.; RAMANI, S. R. *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, 341, n. 6151, p. 1246-1249, Sep 13 2013.
- KIM, J. I.; HUH, J. Y.; SOHN, J. H.; CHOE, S. S. *et al.* Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation. **Mol Cell Biol**, 35, n. 10, p. 1686-1699, May 2015.

KIMURA, H.; KARASAWA, T.; USUI, F.; KAWASHIMA, A. *et al.* Caspase-1 deficiency promotes high-fat diet-induced adipose tissue inflammation and the development of obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 311, n. 5, p. E881-E890, Nov 1 2016.

KOTAS, M. E.; JURCZAK, M. J.; ANNICELLI, C.; GILLUM, M. P. *et al.* Role of caspase-1 in regulation of triglyceride metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 12, p. 4810-4815, Mar 19 2013.

KOUVARI, M.; PANAGIOTAKOS, D. B.; YANNAKOULIA, M.; GEORGUSOPOULOU, E. *et al.* Transition from metabolically benign to metabolically unhealthy obesity and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA cohort study. **Metabolism**, 93, p. 18-24, Apr 2019.

KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; MOLLER, K.; MITTENDORFER, B. *et al.* Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 291, n. 1, p. E108-114, Jul 2006.

KUIDA, K.; LIPPKE, J. A.; KU, G.; HARDING, M. W. *et al.* Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. **Science**, 267, n. 5206, p. 2000-2003, Mar 31 1995.

KWOK, K. H.; LAM, K. S.; XU, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Exp Mol Med**, 48, p. e215, Mar 11 2016.

LAFONTAN, M. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. **Am J Physiol Cell Physiol**, 302, n. 2, p. C327-359, Jan 15 2012.

LAM, Y. Y.; JANOVSKA, A.; MCAINCH, A. J.; BELOBRAJDIC, D. P. *et al.* The use of adipose tissue-conditioned media to demonstrate the differential effects of fat depots on insulin-stimulated glucose uptake in a skeletal muscle cell line. **Obes Res Clin Pract**, 5, n. 1, p. e1-e78, Jan-Mar 2011.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LAUTERBACH, M. A.; HANKE, J. E.; SEREFIDOU, M.; MANGAN, M. S. J. *et al.* Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase. **Immunity**, 51, n. 6, p. 997-1011 e1017, Dec 17 2019.

LI, Y.; YUN, K.; MU, R. A review on the biology and properties of adipose tissue macrophages involved in adipose tissue physiological and pathophysiological processes. **Lipids in Health and Disease**, 19, n. 1, p. 164, 2020/07/09 2020.

LIU, W.; DAVIS, D. W.; RAMIREZ, K.; MCCONKEY, D. J. *et al.* Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. **International Journal of Cancer**, 92, n. 1, p. 26-30, 2001.

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

MARCHINGTON, J. M.; MATTACKS, C. A.; POND, C. M. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. **Comp Biochem Physiol B**, 94, n. 2, p. 225-232, 1989.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, 10, n. 2, p. 417-426, Aug 2002.

MICHAELIS, K. A.; NORGDARD, M. A.; ZHU, X.; LEVASSEUR, P. R. *et al.* The TLR7/8 agonist R848 remodels tumor and host responses to promote survival in pancreatic cancer. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 4682, 2019/10/15 2019.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 2, p. 240-273, Table of Contents, Apr 2009.

MONGRAW-CHAFFIN, M.; FOSTER, M. C.; ANDERSON, C. A. M.; BURKE, G. L. *et al.* Metabolically Healthy Obesity, Transition to Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. **Journal of the American College of Cardiology**, 71, n. 17, p. 1857-1865, 2018/05/01/ 2018.

MOON, J. S.; NAKAHIRA, K.; CHUNG, K. P.; DENICOLA, G. M. *et al.* NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. **Nat Med**, 22, n. 9, p. 1002-1012, Sep 2016.

MORENO-NAVARRETE, J. M.; FERNANDEZ-REAL, J. M. The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 20, n. 4, p. 387-397, 2019/12/01 2019.

MORRIS, P. G.; HUDIS, C. A.; GIRI, D.; MORROW, M. *et al.* Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, 4, n. 7, p. 1021-1029, Jul 2011.

MUNOZ-PLANILLO, R.; KUFFA, P.; MARTINEZ-COLON, G.; SMITH, B. L. *et al.* K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, 38, n. 6, p. 1142-1153, Jun 27 2013.

MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V.; LATINI, C. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **J Lipid Res**, 49, n. 7, p. 1562-1568, Jul 2008.

MURPHY, A. J.; KRAAKMAN, M. J.; KAMMOUN, H. L.; DRAGOLJEVIC, D. *et al.* IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. **Cell Metab**, 23, n. 1, p. 155-164, Jan 12 2016.

MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's immunobiology**. 9th edition. ed. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2016. xx, 904 pages p. 9780815345053 (pbk.).

- MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014.
- NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 3, Mar 1 2012.
- NOLIS, T. Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies. **J Hum Genet**, 59, n. 1, p. 16-23, Jan 2014.
- NOMOTO-KOJIMA, N.; AOKI, S.; UCHIHASHI, K.; MATSUNOBU, A. *et al.* Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. **Cell Tissue Res**, 344, n. 2, p. 287-298, May 2011.
- O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 5, p. 353-364, May 2007.
- ORECCHIONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A. B.; LEY, K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, 10, n. 1084, 2019-May-24 2019. Review.
- OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nat Med**, 18, n. 3, p. 363-374, Mar 6 2012.
- PALUDAN, S. R.; PRADEU, T.; MASTERS, S. L.; MOGENSEN, T. H. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, 21, n. 3, p. 137-150, Mar 2021.
- PARK, Y. W.; ZHU, S.; PALANIAPPAN, L.; HESHKA, S. *et al.* 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**, 163, n. 4, p. 427-436, Feb 24 2003.
- PAUL, W. E. **Fundamental immunology**. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. xviii, 1283 p. p. 9781451117837 (alk. paper) 1451117833 (alk. paper).
- PERREGAUX, D.; BARBERIA, J.; LANZETTI, A. J.; GEOGHEGAN, K. F. *et al.* IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. **J Immunol**, 149, n. 4, p. 1294-1303, Aug 15 1992.
- PRIMEAU, V.; CODERRE, L.; KARELIS, A. D.; BROCHU, M. *et al.* Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. **Int J Obes (Lond)**, 35, n. 7, p. 971-981, Jul 2011.
- PROCHNICKI, T.; MANGAN, M. S.; LATZ, E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. **F1000Res**, 5, 2016.

- PUHL, R. M.; LATNER, J. D.; O'BRIEN, K.; LUEDICKE, J. *et al.* A multinational examination of weight bias: predictors of anti-fat attitudes across four countries. **Int J Obes (Lond)**, 39, n. 7, p. 1166-1173, Jul 2015.
- RATH, M.; MÜLLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I. *et al.* Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, 5, n. 532, 2014-October-27 2014. Review.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. 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**, 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.
- RHEINHEIMER, J.; DE SOUZA, B. M.; CARDOSO, N. S.; BAUER, A. C. *et al.* Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. **Metabolism**, 74, p. 1-9, Sep 2017.
- RICHARD, A. J.; WHITE, U.; ELKS, C. M.; STEPHENS, J. M. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. *In*: FEINGOLD, K. R.; ANAWALT, B., *et al* (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth (MA), 2000.
- RITTER, A.; FRIEMEL, A.; FORNOFF, F.; ADJAN, M. *et al.* Characterization of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral adipose tissues and their function in breast cancer cells. **Oncotarget**, 6, n. 33, p. 34475-34493, Oct 27 2015.
- ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A. *et al.* A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 2, p. 588-593, Jan 20 1998.
- RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **J Biol Chem**, 239, p. 375-380, Feb 1964.
- ROH, J. S.; SOHN, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. **Immune Netw**, 18, n. 4, p. e27, Aug 2018.
- RONDINI, E. A.; GRANNEMAN, J. G. Single cell approaches to address adipose tissue stromal cell heterogeneity. **Biochem J**, 477, n. 3, p. 583-600, Feb 14 2020.
- RONDINONE, C. M. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. **Endocrine**, 29, n. 1, p. 81-90, Feb 2006.
- ROSE, G.; SHAPIRO, B. The synthesis of fatty acids and glycogen by adipose tissue in vitro. **Biochim Biophys Acta**, 18, n. 4, p. 504-510, Dec 1955.
- ROSENBLUM, M. D.; REMEDIOS, K. A.; ABBAS, A. K. Mechanisms of human autoimmunity. **J Clin Invest**, 125, n. 6, p. 2228-2233, Jun 2015.
- RUBINO, F.; PUHL, R. M.; CUMMINGS, D. E.; ECKEL, R. H. *et al.* Joint international consensus statement for ending stigma of obesity. **Nature Medicine**, 26, n. 4, p. 485-497, 2020/04/01 2020.

RUDERMAN, N. B.; SCHNEIDER, S. H.; BERCHTOLD, P. The “metabolically-obese,” normal-weight individual. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 34, n. 8, p. 1617-1621, 1981.

RUGGIERO, A. D.; KEY, C.-C. C.; KAVANAGH, K. Adipose Tissue Macrophage Polarization in Healthy and Unhealthy Obesity. **Frontiers in nutrition**, 8, p. 625331-625331, 2021.

RUTKOWSKI, J. M.; STERN, J. H.; SCHERER, P. E. The cell biology of fat expansion. **J Cell Biol**, 208, n. 5, p. 501-512, Mar 2 2015.

SAGOO, P.; GARCIA, Z.; BREART, B.; LEMAITRE, F. *et al.* In vivo imaging of inflammasome activation reveals a subcapsular macrophage burst response that mobilizes innate and adaptive immunity. **Nat Med**, 22, n. 1, p. 64-71, Jan 2016.

SANMAN, L. E.; QIAN, Y.; EISELE, N. A.; NG, T. M. *et al.* Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death. **Elife**, 5, p. e13663, Mar 24 2016.

SCHAFFLER, A.; NEUMEIER, M.; HERFARTH, H.; FURST, A. *et al.* Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. **Biochim Biophys Acta**, 1732, n. 1-3, p. 96-102, Dec 30 2005.

SCHEJA, L.; HEEREN, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. **Nat Rev Endocrinol**, 15, n. 9, p. 507-524, Sep 2019.

SCHELLER, E. L.; CAWTHORN, W. P.; BURR, A. A.; HOROWITZ, M. C. *et al.* Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. **Trends Endocrinol Metab**, 27, n. 6, p. 392-403, Jun 2016.

SCHELLER, E. L.; ROSEN, C. J. What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1311, n. 1, p. 14-30, 2014.

SCHLAEPFER, I. R.; JOSHI, M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Endocrinology**, 161, n. 2, Feb 1 2020.

SEMPLE, R. K.; CROWLEY, V. C.; SEWTER, C. P.; LAUDES, M. *et al.* Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 28, n. 1, p. 176-179, Jan 2004.

SERBULEA, V.; UPCHURCH, C. M.; SCHAPPE, M. S.; VOIGT, P. *et al.* Macrophage phenotype and bioenergetics are controlled by oxidized phospholipids identified in lean and obese adipose tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115, n. 27, p. E6254-E6263, 2018.

SHAO, M.; WANG, Q. A.; SONG, A.; VISHVANATH, L. *et al.* Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. **Diabetes**, 68, n. 10, p. 1874-1885, 2019.

SHAPIRO, H.; PECHT, T.; SHACO-LEVY, R.; HARMAN-BOEHM, I. *et al.* Adipose tissue foam cells are present in human obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 3, p. 1173-1181, Mar 2013.

SHENG, C. H.; DI, J.; JIN, Y.; ZHANG, Y. C. *et al.* Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. **Endocrine**, 33, n. 2, p. 135-143, Apr 2008.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, 116, n. 11, p. 3015-3025, Nov 2006.

SIMS, E. A. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? **Metabolism**, 50, n. 12, p. 1499-1504, Dec 2001.

SINGLA, P.; BARDOLOI, A.; PARKASH, A. A. Metabolic effects of obesity: A review. **World J Diabetes**, 1, n. 3, p. 76-88, Jul 15 2010.

SOUZA-MOREIRA, L.; SOARES, V. C.; DIAS, S.; BOZZA, P. T. Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Lipid Metabolism and Lipid Droplet Biogenesis via AKT/mTOR -PPARgamma Signalling in Macrophages. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 20304, Dec 30 2019.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, 104, n. 4, p. 531-543, Feb 23 2001.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, 409, n. 6818, p. 307-312, Jan 18 2001.

STIENSTRA, R.; JOOSTEN, L. A.; KOENEN, T.; VAN TITS, B. *et al.* The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. **Cell Metab**, 12, n. 6, p. 593-605, Dec 1 2010.

STUTZ, A.; HORVATH, G. L.; MONKS, B. G.; LATZ, E. ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. *In: DE NARDO, C. M. e LATZ, E. (Ed.). The Inflammasome: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 91-101.

SUBBARAMAIAH, K.; HOWE, L. R.; BHARDWAJ, P.; DU, B. *et al.* Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, 4, n. 3, p. 329-346, 2011.

SUN, W.; MODICA, S.; DONG, H.; WOLFRUM, C. Plasticity and heterogeneity of thermogenic adipose tissue. **Nat Metab**, 3, n. 6, p. 751-761, Jun 2021.

SUTTERWALA, F. S.; OGURA, Y.; SZCZEPANIK, M.; LARA-TEJERO, M. *et al.* Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. **Immunity**, 24, n. 3, p. 317-327, Mar 2006.

SZASZ, T.; WEBB, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clin Sci (Lond)**, 122, n. 1, p. 1-12, Jan 2012.

TAKEDA, K.; TSUTSUI, H.; YOSHIMOTO, T.; ADACHI, O. *et al.* Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. **Immunity**, 8, n. 3, p. 383-390, Mar 1998.

- TING, J. P.; LOVERING, R. C.; ALNEMRI, E. S.; BERTIN, J. *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, 28, n. 3, p. 285-287, Mar 2008.
- TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 1-21, Jan 2013.
- TZENG, T. C.; SCHATTGEN, S.; MONKS, B.; WANG, D. *et al.* A Fluorescent Reporter Mouse for Inflammasome Assembly Demonstrates an Important Role for Cell-Bound and Free ASC Specks during In Vivo Infection. **Cell Rep**, 16, n. 2, p. 571-582, Jul 12 2016.
- VILLARROYA, F.; CEREIJO, R.; VILLARROYA, J.; GIRALT, M. Brown adipose tissue as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, 13, n. 1, p. 26-35, 2017/01/01 2017.
- VISHVANATH, L.; MACPHERSON, K. A.; HEPLER, C.; WANG, Q. A. *et al.* Pdgfrbeta+ Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. **Cell Metab**, 23, n. 2, p. 350-359, Feb 9 2016.
- WANG, C. Y.; LIAO, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. **Methods Mol Biol**, 821, p. 421-433, 2012.
- WANG, H.; CAPELL, W.; YOON, J. H.; FAUBEL, S. *et al.* Obesity development in caspase-1-deficient mice. **Int J Obes (Lond)**, 38, n. 1, p. 152-155, Jan 2014.
- WANG, Q.; JIANG, L.; WANG, J.; LI, S. *et al.* Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. **Hepatology**, 49, n. 4, p. 1166-1175, 2009.
- WARFEL, J. D.; VANDANMAGSAR, B.; DUBUISSON, O. S.; HODGESON, S. M. *et al.* Examination of carnitine palmitoyltransferase 1 abundance in white adipose tissue: implications in obesity research. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 312, n. 5, p. R816-r820, May 1 2017.
- WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. **J Immunol**, 134, n. 2, p. 982-989, Feb 1985.
- WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
- WILSON, D. F.; MATSCHINSKY, F. M. Metabolic Homeostasis in Life as We Know It: Its Origin and Thermodynamic Basis. **Front Physiol**, 12, p. 658997, 2021.
- WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiol (Oxf)**, 205, n. 2, p. 194-208, Jun 2012.
- WU, J.; BOSTRÖM, P.; SPARKS, Lauren M.; YE, L. *et al.* Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, 150, n. 2, p. 366-376, 2012/07/20/ 2012.

XING, J. H.; LI, R.; GAO, Y. Q.; WANG, M. Y. *et al.* NLRP3 inflammasome mediate palmitate-induced endothelial dysfunction. **Life Sci**, 239, p. 116882, Dec 15 2019.

YAMANISHI, K.; MAEDA, S.; KUWAHARA-OTANI, S.; HASHIMOTO, T. *et al.* Deficiency in interleukin-18 promotes differentiation of brown adipose tissue resulting in fat accumulation despite dyslipidemia. **Journal of Translational Medicine**, 16, n. 1, p. 314, 2018/11/19 2018.

YANG, R. B.; MARK, M. R.; GRAY, A.; HUANG, A. *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, 395, n. 6699, p. 284-288, Sep 17 1998.

YKI-JÄRVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, 2, n. 11, p. 901-910, 2014.

YOUNG, P.; ARCH, J. R.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **FEBS Lett**, 167, n. 1, p. 10-14, Feb 13 1984.

ZAJD, C. M.; ZIEMBA, A. M.; MIRALLES, G. M.; NGUYEN, T. *et al.* Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used. **Frontiers in Immunology**, 11, n. 269, 2020-February-21 2020. Original Research.

ZHANG, F.; HAO, G.; SHAO, M.; NHAM, K. *et al.* An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. **Cell Metab**, 27, n. 1, p. 252-262 e253, Jan 9 2018.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372, n. 6505, p. 425-432, Dec 1 1994.

ZHAO, Y.; YANG, J.; SHI, J.; GONG, Y. N. *et al.* The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, 477, n. 7366, p. 596-600, Sep 14 2011.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. **Cell Discov**, 6, n. 1, p. 36, Jun 9 2020.

Anexos

I – Produções durante o doutorado

- Ananda de M Araújo, Patrícia B Botelho, Dalila J S Ribeiro, (et al). A multiple-strain probiotic product provides a better enzymatic antioxidant response in subjects with constipation in a double-blind randomized controlled trial. *Nutrition*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111225>
- de Sant'Ana, L. P*, Ribeiro, D. J. S*, (et al). Absence of the Caspases 1/11 Modulates Liver Global Lipid Profile and Gut Microbiota in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. *Frontiers in Immunology*, 2020, doi: [10.3389/fimmu.2019.02926](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02926) (*equal contribution)
- Corrêa, R., Silva, L. F. F., Ribeiro, D. J. S., (et al). Lysophosphatidylcholine induces NLRP3 inflammasome-mediated foam cell formation and pyroptosis in human monocytes and endothelial cells. *Frontiers in Immunology* 2020, doi: [10.3389/fimmu.2019.02927](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02927)
- Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Manickchand, J. R. ;Correa, R. ; Ribeiro, D. J. S. (et al). Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PLoS One* 2019. doi: [10.1371/journal.pone.0220656](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656).