

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**Ana Luíza da Silva Albertoni**

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR FATORES  
SECRETADOS POR ADIPÓCITOS NIH3T3-L1 DURANTE A  
INFECCÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG, *IN VITRO***

TESE

JUIZ DE FORA

2021

ICB/UFJF

ANA LUÍZA DA SILVA ALBERTONI

MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR  
FATORES SECRETADOS POR ADIPÓCITOS NIH3T3-L1  
DURANTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG,

**ANA LUÍZA DA SILVA ALBERTONI**

**MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR FATORES  
SECRETADOS POR ADIPÓCITOS NIH3T3-L1 DURANTE A  
INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG, *IN VITRO***

“Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Elaine de Almeida**

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva Albertoni, Ana Luíza .

MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR FATORES SECRETADOS POR ADIPÓCITOS NIH3T3-L1 DURANTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis* BCG, IN VITRO / Ana Luíza da Silva Albertoni. -- 2021.

134 f.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. microvesículas . 2. exossomos. 3. corpúsculos lipídicos. 4. infecção. 5. ppargamma. I. de Almeida, Patrícia Elaine , orient. II. Título.

**Autor: Ana Luíza da Silva Albertoni**

**Título: Modulação da ativação de macrófagos por fatores secretados por adipócitos NIH3T3-L1 durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, *in vitro***

“Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Aprovada em 15 de dezembro de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

**Dra. Patrícia Elaine de Almeida - Orientador**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Patricia Torres Bozza Viola**  
Instituto Oswaldo Cruz

**Prof. Dra. Livia Teixeira**  
Instituto do Coração (InCor)

**Dr. Bruno de Siqueira Mietto**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Ana Eliza Andreazi**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 13/12/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Elaine de Almeida, Professor(a)**, em 15/12/2021, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno de Siqueira Mietto, Professor(a)**, em 15/12/2021, às 19:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Eliza Andreazzi, Professor(a)**, em 16/12/2021, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Torres Bozza Viola, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 22:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Luíza da Silva Albertoni, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 22:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Teixeira, Usuário Externo**, em 03/01/2022, às 20:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f(www2.u f.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0614227** e o código CRC **4DCF61E1**.

“Dedico à minha família, que sempre se fizeram presentes, nunca deixando de acreditar nos meus sonhos”.

## AGRADECIMENTOS

*“Aqueles que passam por nós, não vão sem nós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*

Antoine de Saint-Exupéry.

Durante pouco mais de 4 anos em que iniciei esta pesquisa foi uma árdua jornada de desafios, construção e amadurecimento. Nenhuma etapa foi realizada de forma fácil e sem esforço. Portanto, hoje venho agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com essa realização.

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar todos os meus passos e me dar forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Antônio José e Maria Imaculada, por toda confiança e incentivo, pela educação base, valores ensinados, apoio nos meus estudos e por muitas vezes renunciarem aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Essa conquista também é de vocês!

À minha avó Arminda, que mesmo não estando entre nós nessa vida terrena sei que cuida de mim em todos os momentos. Obrigada vó, por todo amor incondicional e eterno, por me ensinar a ser nobre, na essência da palavra e por toda sabedoria a mim passada.

Ao meu querido irmão, Luis Gustavo, que vibra comigo a cada vitória, que alegra muito os meus dias e me dá todo apoio emocional. Obrigada por ter embarcado comigo nessa vida acadêmica. Saiba que você foi fundamental na construção dessa tese. Espero ter contribuído um pouquinho que seja no seu crescimento também!

Ao meu namorado Luis Orlando, sem palavras para agradecer tamanho apoio. Você é um dos principais personagens dessa história. Obrigada pela força e incentivo nos momentos que mais precisei, pela compreensão quanto aos finais de semana de estudo, leitura, de trabalho. Sem você provavelmente eu não teria chegado tão feliz e realizada como cheguei até aqui.

Agradeço à minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Patrícia Elaine de Almeida por cada ensinamento e cada palavra! Agradeço imensamente por toda confiança depositada em mim, por toda experiência compartilhada, pela disponibilidade e pelas ajudas na bancada, pela paciência e conselhos. Para mim, foi uma honra e orgulho tê-la como orientadora por todos esses anos.

Gostaria de agradecer também, à banca examinadora pela disponibilidade, por todas as considerações, sugestões, correções, ressalvas, críticas, elogios, contribuindo assim para a finalização deste trabalho.



Agradeço também aos meus amigos e minha família que me acompanham nessa jornada, e ao laboratório de Biologia Celular. Sem vocês tudo seria mais difícil. Obrigada pelo apoio emocional, ensinamentos, compreensões, dedicações, contribuições e pelo bom humor de cada dia!

Por fim, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias e à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) por possibilitar a concretização dessa tese e por proporcionar meios que me permitiram alcançar o conhecimento, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também as agências de fomento que nos auxiliaram com recursos e financiamentos imprescindíveis: Fapemig, CNPq, Laboratório de Imunofarmacologia (Fio Cruz), Laboratório de Bioquímica (UFJF), Laboratório de Imunologia (UFJF), e LIP (UFJF).

## RESUMO

Introdução: Considerada uma doença crônica e multifatorial, a obesidade é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Além do excesso de gordura corporal, a obesidade é caracterizada por um estado inflamatório de baixo grau, conhecido como metainflamação. Fatores genéticos, ambientais e distúrbios metabólicos têm sido propostos como gatilhos para inflamação que envolve a sinalização/interação entre os adipócitos e macrófagos. Fatores secretados por adipócitos (FSA), são propostos como moduladores de perfil macrofágico (M1, M2) e são capazes de intensificar a inflamação metabólica. Entre eles, estão as citocinas, adipocinas e vesículas extracelulares (VE's). Além disso, fatores de transcrição têm um papel importante como o receptor nuclear PPAR $\gamma$ , ativado por ligantes lipídicos, com propriedades imunorreguladoras na função dos macrófagos. PPAR $\gamma$  induz a formação de corpúsculos lipídicos (CL)s durante infecções por patógenos intracelulares, como por *Mycobacterium bovis* BCG. Os CLs são organelas dinâmicas com funções no estoque lipídico, síntese de mediadores inflamatórios, sinalização celular e são sítios intracelulares para a sobrevivência de patógenos. Os mecanismos envolvidos na via de sinalização e metabolismo lipídico por fatores secretados por adipócitos e macrófagos, bem como seu impacto no curso da infecção por patógenos intracelulares não estão bem conhecidos. Métodos: as análises de LBs foram realizada por microscopia de campo claro e fluorescência, o ensaio de citocinas por ELISA e expressão de PPAR $\gamma$  por Western Blot. O isolamento de EVs foi feito por uma série de centrifugações seguidas de quantificação por citometria de fluxo, caracterização por Zetasizer, e dosagem protéica por Micro BCA. Resultados: A infecção por BCG induz a formação de CLs, que foi potencializada na presença de FSA. Concomitantemente, a expressão do PPAR $\gamma$  também foi potencializada por FSA. Além disso, GW9662 inibiu a expressão desse receptor durante a infecção. A produção de TNF- $\alpha$  foi regulada negativamente, enquanto IL-10 e KC foram positivamente modulados em macrófagos infectados e estimulados com FSA. Além disso, a produção de adiponectina foi aumentada em macrófagos controles estimulados com FSA, um efeito que foi inibido durante a infecção por BCG. No estudo sobre o papel das subpopulações de VEs, (microvesículas ou exossomos), verificou-se uma modulação positiva sobre a biogênese dos CLs e a ativação de macrófagos, induzindo a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-10. Além disso, as microvesículas foram capazes de induzir KC, que foi modulada negativamente nos grupos infectados, efeito que não foi observado para macrófagos estimulados com exossomos. Conclusão: Nossos resultados sugerem que VEs têm um papel modulador na ativação de macrófagos infectados com BCG, atribuído à formação de CLs, expressão de PPAR $\gamma$  e síntese de citocinas, que podem contribuir para mudanças no estado de polarização destas células. No entanto, estudos futuros ainda serão realizados para ajudar a elucidar os mecanismos de modulação das VEs sobre macrófagos durante infecções por patógenos intracelulares, como *M. bovis* BCG.

**Palavras chave:** macrófagos, corpúsculos lipídicos, PPAR $\gamma$ , microvesículas, exossomos, *Mycobacterium bovis*

## ABSTRACT

Introduction: Considered a chronic and multifactorial disease, obesity is one of the main public health problems in the world. In addition to excess body fat, obesity is characterized by a low-grade inflammatory state (metainflammation). Genetic, environmental factors and metabolic disorders have been proposed as triggers for inflammation that involves the signaling/interaction between adipocytes and macrophages. Factors secreted by adipocytes (FSA), are proposed as modulators of macrophagic profile (M1, M2) and are able to intensify the metabolic inflammation. Among them, there are cytokines, adipokines and extracellular vesicles (EV's). In addition, transcriptional factors it has an important role, PPAR $\gamma$  is a nuclear receptor activated by lipid ligands, with immunoregulatory properties in the macrophage function. PPAR $\gamma$  induces the lipid bodies (LB)s formation during intracellular pathogens infections, such as *Mycobacterium bovis* BCG. The LBs are dynamic organelles with functions in the lipid stock, synthesis of inflammatory mediators, cell signaling and function as sites for the survival of pathogens. The mechanisms involved in the signaling pathway activation and lipid metabolism by factors secreted by adipocytes and macrophages, as well as their impact on the course of infection by intracellular pathogens are not well known. Methods: LBs count was performed by fluorescence microscopy, cytokine assay by ELISA, and PPAR $\gamma$  expression by Western Blot. Isolation of EVs was done by a series of centrifugations followed by characterization and quantification by flow cytometry, Zeta Size and Micro BCA. Results: BCG infection induce LBs formation, which was potentialized by FSA presence. Concomitantly, the expression of PPAR $\gamma$  also was potentialized by FSA. Moreover, GW9662 inhibited the expression of this receptor during the infection. The production of TNF- $\alpha$  was negatively regulated, while IL-10 and KC were up modulated in macrophages infected and stimulated with FSA. Further, the adiponectin production was increased in control macrophages stimulated with FSA, an effect that was inhibited during the BCG infection. Furthermore, subpopulations of EV's, the microvesicles or the exosomes, positively modulate LBs biogenesis and macrophage activation, inducing TNF- $\alpha$  and IL-10 synthesis. In addition, the microvesicles were able to induce KC synthesis, which was negatively modulated in the infected groups, an effect that was not observed for macrophages stimulated with exosomes. Conclusion: Our results suggest that FSA have an important role on BCG-infected macrophages, attributed to the formation of LBs, PPAR $\gamma$  expression, synthesis of cytokines and adipokines, which can contribute to changes in the polarization state. However, future studies will still be carried out to elucidate the real *cross-talk* between adipocytes and macrophages in the face of infections by intracellular pathogens such as *M. bovis* BCG.

**Keywords:** macrophages, lipid bodies, PPAR $\gamma$ , microvesicles and exosomes, *Mycobacterium bovis*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da obesidade pelo mundo.....	22
Figura 2: Crescimento do índice de obesidade no Brasil.....	23
Figura 3: Expansão do tecido adiposo branco na obesidade.....	26
Figura 4: <i>Cross-talk</i> entre macrófagos e adipócitos.....	28
Figura 5: Sinalização de PPAR $\gamma$ .....	30
Figura 6: Morfologia dos Corpúsculos Lipídicos.....	34
Figura 7: Modelo de biogênese do Corpúsculo Lipídico.....	38
Figura 8: TLR2 / CD36 desviam a sinalização intracelular para o aumento da expressão de PPAR $\gamma$ e acumulação de lipídios durante a infecção por <i>M. bovis</i> BCG.....	42
Figura 9: Exemplo ilustrativo da heterogeneidade na composição de microvesículas.....	46
Figura 10: Exemplo ilustrativo da heterogeneidade da composição dos exossomos.....	47
Figura 11: Vias envolvendo a formação de microvesículas e exossomos.....	48
Figura 12: Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1.....	55
Figura 13: Protocolo de isolamento de microvesículas e exossomos.....	57
Figura 14: Análise do processo de diferenciação celular.....	65
Figura 15: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com FSA e infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1.....	66
Figura 16: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1, estimulados ou não com FSA (24 h).....	67
Figura 17: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com meio condicionado de pré-adipócitos NIH3T3-L1 e infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1.....	68
Figura 18: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1, estimulados ou não com meio condicionado de pré-adipócitos NIH3T3-L1 (24 horas).....	69
Figura 19: Síntese de TNF- $\alpha$ (A) e IL-10 (B) em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com FSA.....	70
Figura 20: Produção de citocinas por adipócitos infectados.....	71
Figura 21: Síntese de Adiponectina em 6, 24 e 48 h de estímulo e infecção.....	72
Figura 22: Produção de Nitrito em 6, 24 e 48 h de estímulo e infecção.....	73

Figura 23: Expressão de PPAR $\gamma$ .....	74
Figura 24: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com FSA, tratados ou não com GW9662 e infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1.....	75
Figura 25: Inibição da biogênese de CL's por GW 9662 em macrófagos estimulados ou não com FSA e infectados com BCG ou não.....	76
Figura 26: Síntese de citocinas, TNF- $\alpha$ e IL-10, e da quimiocina KC, por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com FSA, tratados com GW 9662 e infectados ou não com BCG.....	78
Figura 27: Análise por Citometria de fluxo de VE's.....	80
Figura 28: Identificação de subpopulações de VE's, exossomos (A) e microvesículas (B), por número.....	81
Figura 29: Quantificação e depleção de MV's e Exossomos do meio controle RPMI 2% SFB.....	83
Figura 30: Biogênese de CLs frente ao estímulo com 100 $\mu$ M Microvesículas (MV's) e Exossomos (EXO).....	87
Figura 31: Quantificação de corpúsculos lipídicos após tratamento com microvesículas e exossomos (25 $\mu$ m, 50 $\mu$ m, 100 $\mu$ m).....	89
Figura 32: Síntese das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com microvesículas e exossomos em três concentrações distintas.....	91
Figura 33: Síntese de citocinas de KC por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com 100 $\mu$ M microvesículas e exossomos e infecção por BCG.....	93
Figura 34: Modulação de macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG por FSA, MV's e Exossomos.....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA POR NANODROP:.....	85
TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA POR MICRO BCA:.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

15-LO: 15-lipoxigenase  
5-LO: 5-lipoxigenase  
ACSL3: cadeia longa 3 de acil-CoA sintetase  
ADP: Adenosina difosfato  
ADRP: proteína relacionada à diferenciação de adipócitos  
AKT: Protein kinase-B  
AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico AMPc  
AP-1: Ativador da proteína 1  
AP2: Ativador da proteína 2  
ATM's: Macrófagos do tecido adiposo  
BCG: Bacilo *Calmette-Guérin*  
BMP: Receptor bis monoacilglicerol fosfato  
C/EBP: Proteína de ligação ao intensificador CCAAT  
CCL-17: Quimiocina com motivo C-C 17  
CCL-24: Quimiocina com motivo C-C 24  
CCR2: Receptor de quimiocina tipo 2  
CCR5: Receptor de quimiocina 5  
*CD* : *Cluster of differentiation*  
CLs: Corpúsculos lipídicos  
CMV's: Corpos multivesiculare  
COX: Ciclooxygenase  
cPLA2 $\alpha$ : fosfolipase citosólica A2 $\alpha$   
CRP: Proteína c reativa  
DCVs: Doenças cardiovasculares  
DEX: Dexametasona  
DGAT, acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase  
DM2: Diabetes mellitus tipo 2  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
eNOS: Enzima endotelial NO sintase  
EP300: Eroteína E1a de ligação p300  
EVs: Vesículas extracelulares

EXO: Exossomos  
FAS: Ácido graxo sintase  
FATP1: Proteína de transporte de ácido graxo 1  
FBS: Soro fetal bovino  
FITM: Proteínas transmembrana indutoras de armazenamento de gordura  
FOXO1: Forkhead box protein O1  
G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos  
GDF-11: Fator de crescimento e desenvolvimento-11  
GTPases: Hidrolases que se ligam ao nucleotídeo guanosina trifosfato  
HGF: fator de crescimento de hepatócitos  
HIF-1 $\alpha$ : Fator-1 $\alpha$  induzível por hipóxia  
HLA-DR: antígeno leucocitário humano  
hsCRP: Ensaio altamente sensível da proteína c reativa  
IBMX: Metilisobutilxantina  
IFN- $\gamma$ : Interferon – gama  
IGF-1: Fator 1 de crescimento semelhante à insulina  
IL: Interleucina  
iNOS: Enzima NO sintase  
iNOS: óxido nítrico sintase induzível  
INS: Insulina (Ins),  
IRF: Fator regulatório de interferons  
ISEV: sociedade internacional de vesículas extracelulares  
JNK: Quinase N-terminal de c-Jun  
KLF-4: fator 4 semelhante a Krüppel  
LDAF1: fator 1 de montagem de gotícula de lipídio  
LDL: Lipoproteína de baixa densidade  
LO: Lipoxigenase  
LPL: Lipase de lipoproteínas  
LPS: Lipopolissacarídeo  
LTC4: Leucotrieno C4  
LXR: Receptor X do fígado  
M1: macrófagos classicamente ativados  
M2: macrófagos alternativamente ativados  
MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos



MCTP: proteína transmembrana contendo múltiplos domínios C2

MOI: Multiplicidade de infecções

MP: membrana plasmática

MPs: Micropartículas

MS: Ministério da Saúde

MSC's: células tronco mesenquimais

MV'S: microvesículas

NF-kB: Fator nuclear kappa B

NGF: fator de crescimento do nervo

NKT: células T natural killer

NLR P3: Receptor NOD like de proteína 3

NLR: Receptor NOD like

NO: óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORO: Oil Red O

ORP: proteína de ligação ao oxisterol

ox-LDL: Lipoproteína de baixa densidade oxidada

oxLDL: Proteína de baixa densidade oxidada

PAF: Fator ativador de plaquetas

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

PAMP: Padrão molecular associado à patógeno

PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos

PAT: Família composta por perilipina, ADRP e TIP47

PGC-1 $\alpha$ : coativador-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma

PGE 2: Prostaglandinas 2

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA: proteína cinase A

PLA2: Fosfolipase A2

PLIN: Perilipinas

PPAR $\gamma$ : Receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomos

PPRE: elemento de resposta AO proliferador de peroxissomo

RANTES: Regulador sob ativação normalmente expressa e secretada por células T

RE: Retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: Receptor X retinóico

TAB: Tecido Adiposo Branco

TAGs: Triacilgliceróis

TB: Tuberculose

TGF $\beta$ : Fator de crescimento tumoral

TIP47 Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons

TLR: Receptor *Toll-like*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral – alfa

TXNIP: Proteína tiorredoxina

UFC: Unidade formadora de colônia

VE: vesícula extracelular

VEGF-A: fator A de crescimento endotelial vascular

VIL: vesículas intraluminais

VPS: classificação de proteína vacuolar

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 – OBESIDADE E INFLAMAÇÃO.....	22
1.2 – ATIVAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR E PERFIL MACROFÁGICO DURANTE A METAINFLAMAÇÃO.....	27
1.3 – PPAR $\gamma$ E METABOLISMO LIPÍDICO.....	29
1.4 – CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	32
1.4.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	32
1.4.2 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	36
1.5 – ATIVAÇÃO MACROFÁGICA E INFECÇÃO MICOBACTERIANA.....	41
1.6 – VESÍCULAS EXTRACELULARES:	
1.6.1- CARACTERIZAÇÃO.....	44
1.6.2- PAPEL DAS MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ADIPÓCITOS E MACRÓFAGOS E EM INFECÇÕES INTRACELULARES.....	48
<b>2 – JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>52</b>
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
OBJETIVO GERAL.....	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 – CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1.....	55
4.2 – ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS.....	55
4.3 – DEPLEÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	57
4.4 – CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	
4.4.1 - CITOMETRIA DE FLUXO.....	58
4.4.2 - ZETA SIZER.....	59
4.4.3 - NANODROP.....	59
4.4.4 – MICRO BCA.....	59
4.5 – OBTENÇÃO DE CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	59
4.6 – CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEWBAUER.....	60
4.7 – ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS (CONTENDO FATORES SECRETADOS POR ADIPÓCITOS –	

FSA) DIFERENCIADOS.....	60
4.8 – ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ADIPÓCITOS.....	61
4.9 – INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	61
4.10 – COLORAÇÃO COM OIL RED O E BODIPY – ANÁLISE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	61
4.11 – ESTÍMULO COM GW 9662 – ANTAGONISTA DE PPAR $\gamma$ .....	62
4.12 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	62

## 5 – RESULTADOS

5.1 – DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS NIH3T3-L1 ...	64
5.2 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS (CL) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA).....	65
5.3 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS (CL) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE PRÉ-ADIPÓCITOS.....	67
5.4 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA).....	69
5.5 – PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ E IL-10 EM ADIPÓCITOS INFECTADOS.....	70
5.6 – PRODUÇÃO DE ADIPOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA).....	71
5.7 – PRODUÇÃO DE NITRITO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA).....	73
5.8 – EXPRESSÃO DE PPAR $\gamma$ EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA).....	74

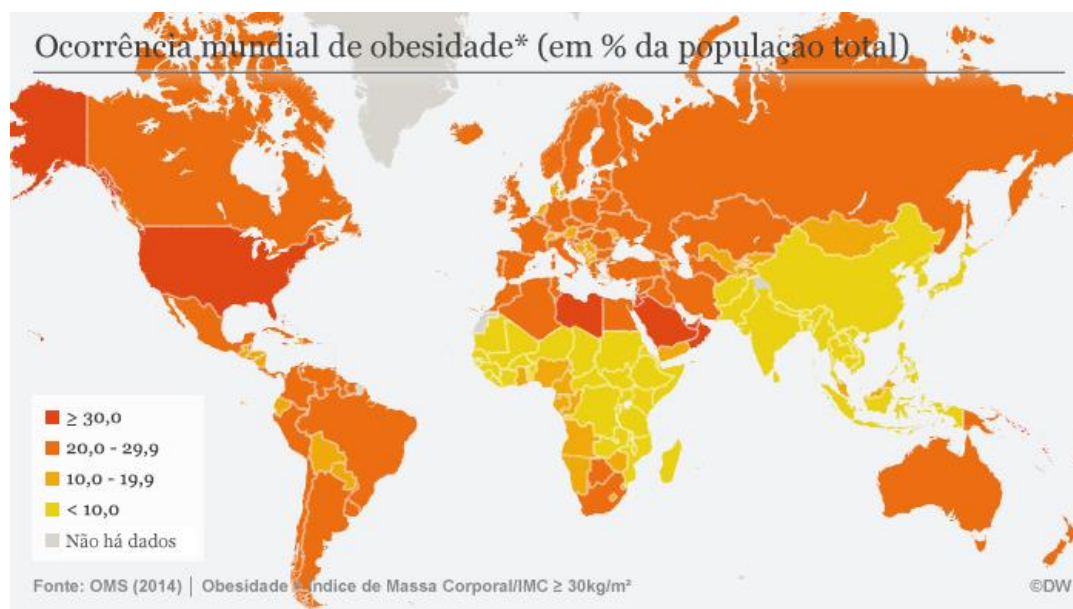
5.9 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS FRENTE À INIBIÇÃO DE PPAR $\gamma$ POR GW 9662 EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS.....	74
5.10 – SÍNTESE DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA), TRATADOS COM GW9662.....	77
5.11 – ANÁLISE DE SUB-POPULAÇÕES DE VE'S	
5.11.1 - CITOMETRIA DE FLUXO.....	79
5.11.2 – ANÁLISE DO TAMANHO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS.....	80
5.11.3 – PESQUISA DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NO MEIO RPMI CONTENDO 2% DE SORO FETAL BOVINO (FBS).....	82
5.11.4 – ANÁLISE DO CONTEUDO PROTÉICO DAS AMOSTRAS DE FSA.....	84
5.12 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium Bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MICROVESÍCULAS (MV's) OU EXOSSOMOS (EXO's).....	86
5.13 – SÍNTESE DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS.....	89
5.14 – SÍNTESE DE KC POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS.....	92
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1– OBESIDADE E META-INFLAMAÇÃO

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, 39% (ou 1,9 bilhão) da população adulta mundial apresentava sobrepeso e 13% (650 milhões) era obesa. Sua prevalência global continua aumentando e, se a tendência continuar, alcançará 18% em homens e 21% em mulheres até 2025 (NCD-RisC, 2016). A maioria da população mundial vive em países onde pessoas com sobrepeso e obesidade morrem mais que pessoas abaixo do peso (OMS, 2016) (Figura 1). Outro dado preocupante é com relação à obesidade infantil, onde 41 milhões de crianças com menos de 5 anos apresentaram sobrepeso ou obesidade em 2016 (OMS, 2016).

**Figura 1**

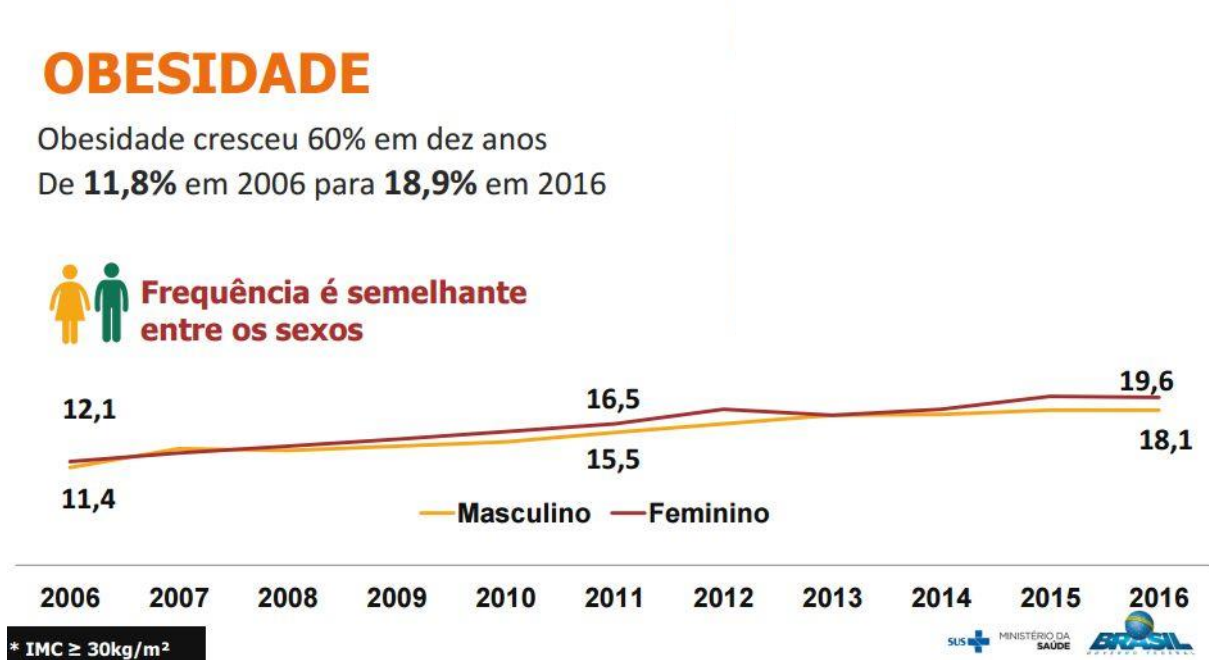


**Figura 1: Distribuição da obesidade pelo mundo.** Fonte: Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/dois-ter%C3%A7os-da-popula%C3%A7%C3%A3o-mundial-se-alimentam-mal/a-18839529>

No Brasil, os índices permanecem preocupantes. Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde (MS) mostrou que o número de obesos no país aumentou 67,8%

entre 2006 e 2018, saindo de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2018. No entanto, nos últimos quatro anos, o Brasil apresenta taxas estáveis da doença. Desde 2015, a prevalência de obesidade se manteve em 18,9%, coincidindo com uma mudança adquirida por boa parte da população ao optar por hábitos de vida mais saudáveis, é o que aponta a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) (MS, 2019) (Figura 2).

**Figura 2**



**Figura 2: Crescimento do índice de obesidade no Brasil.** Fonte: <https://www.endocrino.org.br/ministerio-da-saude-divulga-dados-do-vigitel-2016/>

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excessivo acúmulo de gordura corporal e diminuição do gasto de energia, o que resulta em uma hipertrofia do tecido adiposo, normalmente associada a outros problemas de saúde, comprometendo ainda mais o estado de saúde do indivíduo (Gregor e Hotamisligil, 2011; Kanneganti and Dixit 2012).

Nos seres humanos, o tecido adiposo branco – TAB responde por um fornecimento excessivo de ácidos graxos através da hipertrofia e hiperplasia de adipócitos. Juntos, estes dois processos caracterizam a adipogênese, isto é, a geração de adipócitos a partir de células precursoras (Spalding et al. 2008). Alterações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem devido à ativação de

suas ações metabólicas típicas: lipogênese e a lipólise. Quando o aumento em diâmetro dos adipócitos atinge um grau máximo e a capacidade de armazenamento de gordura se exaure, novas células são recrutadas para esse tecido. Adipócitos muito grandes podem perder a capacidade de estocagem de gordura e tornam-se mais lipolíticos, isso resulta no aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma e danifica a função de órgãos não adiposos, num processo identificado como lipotoxicidade (De Fronzo et al. 2004).

Vários peptídeos bioativos liberados por adipócitos já foram descritos, alguns deles capazes de atuar como hormônios (Lafontan et al. 2005; Blaszczak, Jalilvand, and Hsueh 2021). Entre as citocinas e adipocinas destacam-se a leptina, a adiponectina, a adiposina, a resistina, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), o fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), a proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) a visfatina, entre outros. Com exceção da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores tendem a intensificar com a obesidade (Maury and Brichard 2010; Paniagua et al. 2016; Maury and Brichard 2010; Engin et al. 2017; Longo et al. 2019). Muitos deles, como o TNF- $\alpha$ , a resistina, o PAI-1, a IL-6 e a MCP-1, são diretamente associados a indução de resistência a insulina, a hipercoagulabilidade e a aterogênese, que, associados à lipotoxicidade, geram hipertensão, intensificam estados pró-inflamatórios, aumentam riscos cardiovasculares, acidentes tromboembólicos, diabetes tipo 2 (DM2), esteatose hepática, neurodegeneração, doença biliar e certos tipos de câncer (Hotamisligil et al. 2006).

A descoberta de que a própria obesidade resulta em um estado inflamatório nos tecidos, incluindo o adiposo, tem impulsionado pesquisas que estudam os mecanismos inflamatórios na obesidade (Gregor e Hotamisligil, 2011; Deng et al. 2013; 2017; Blaszczak, Jalilvand, and Hsueh 2021).

A metainflamação ou inflamação metabólica, é definida como inflamação crônica e de baixo grau orquestrada por células adiposas e imunológicas em resposta ao excesso de nutrientes (considerado o gatilho inflamatório na obesidade), com diversos efeitos metabólicos, contribuindo também para a resistência à insulina e disfunção no metabolismo do indivíduo (Blaszczak, Jalilvand, and Hsueh 2021). Durante a metainflamação, uma série de citocinas e adipocinas são produzidas pelo tecido adiposo branco (TAB), resultando na ativação duradoura do sistema

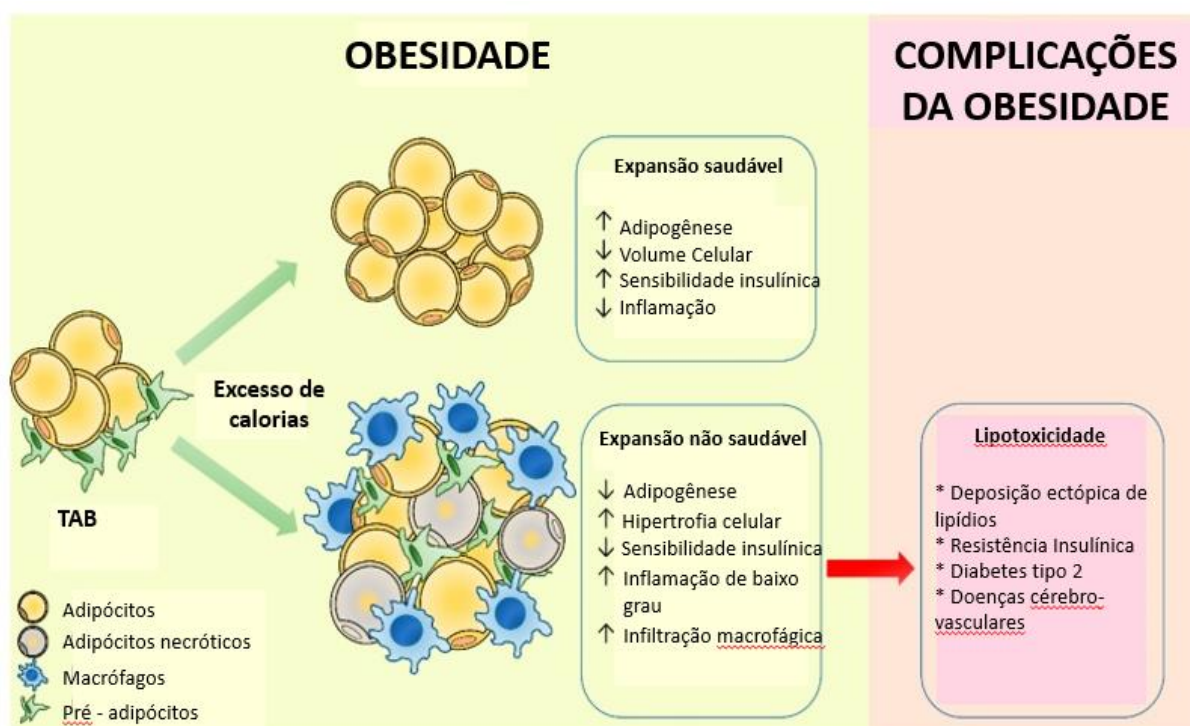


imunológico, e no recrutamento de células imunológicas para este tecido (Gregor e Hotamisligil, 2011; Engin et al. 2017; Blaszczak, Jalilvand, and Hsueh 2021).

A primeira descoberta de inflamação em tecidos de obesos revelou níveis aumentados da citocina TNF- $\alpha$ , no tecido adiposo (e em adipócitos) de camundongos obesos comparados com eutróficos (Hotamisligil et al. 1995). O TNF- $\alpha$ , é um indutor de lipólise em indivíduos obesos e inibidor da síntese lipídica. Pode ser secretado juntamente à IL-6 por macrófagos infiltrados no tecido adiposo hipertrofiado, sendo este um aspecto importante no desenvolvimento da síndrome metabólica, pois potencializa a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Guilherme et al. 2008; Greenberg et al. 2011; Paniagua et al. 2016; Hotamisligil et al. 2006; Maury and Brichard, 2010). Portanto, o TNF- $\alpha$  pode contribuir para o aumento de ácidos graxos circulantes, levando ao acúmulo de triglicerídeos e lipídios estocados ectopicamente em hepatócitos, células  $\beta$  e células musculares, o que induz estresse e disfunção nessas células (Guilherme et al. 2008; Greenberg et al. 2011).

Em um estado de sobrecarga metabólica, onde a ingesta alimentar supera o gasto energético, o organismo tenta equilibrar este desbalanço, secretando insulina, estocando lipídios no tecido adiposo e oxidando ácidos graxos no músculo (Hotamisligil, et al. 2006). Mantida esta sobrecarga, fatores como a lipotoxicidade dos ácidos graxos em excesso, a ativação de macrófagos residentes e a secreção de quimiocinas e citocinas, levam ao recrutamento de células do sistema imune para o tecido adiposo. Desse modo, processos inflamatórios são então desencadeados, ocorrendo o recrutamento de mais macrófagos e outras células do sistema imune para o local, induzido pela secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas por adipócitos e macrófagos residentes, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas, como a MCP-1 (Xu et al. 2003; Weisberg et al. 2003; Hotamisligil et al. 2006; Guilherme et al. 2008; Engin et al. 2017; Xu et al. 2003; Weisberg et al. 2003, Engin et al. 2017) (Figura 3).

Figura 3



**Figura 3: Expansão do tecido adiposo branco na obesidade.** Expansão do tecido adiposo branco na obesidade. O tecido adiposo branco responde ao excesso calórico através de uma expansão saudável ou não. A expansão saudável através da hiperplasia adipocitária protege contra as complicações metabólicas da obesidade. A expansão não saudável através da hipertrofia de adipócitos promove as complicações metabólicas associadas à obesidade. O ganho de peso corporal devido ao consumo de dietas hipercalóricas leva a uma sobrecarga metabólica, com aumento de triglicerídeos e glicose no sangue (Adaptado de Longo et al. 2019).

A glicotoxicidade e a lipotoxicidade induzem uma característica proinflamatória em macrófagos que residem ou invadem o tecido adiposo e vasculatura, sendo responsáveis por efeitos oxidativos e estresse do retículo endoplasmático (Nguyen et al. 2007; Vandanmagsar et al. 2011). Isso, por sua vez, provoca a ativação da proteína tioredoxina (TXNIP) e da família do receptor NOD-like (NLR) – que ativam o inflamassomo NLRP3, aumentando a liberação de IL-1 $\beta$  na sua forma ativa (Zhou et al. 2010; Dinarello et al. 2009). A inflamação amplificada por IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de várias citocinas e quimiocinas, e favorece o recrutamento de mais macrófagos para o tecido adiposo e vasos sanguíneos (Vandanmagsar et al. 2011; Kim et al. 2006).

Além disso, alterações na microbiota intestinal juntamente ao aumento da permeabilidade intestinal de lipopolissacarídeos de paredes bacterianas (endotoxinas) podem promover uma potencialização da inflamação (Belkaid and Hand

2014; Patterson et al. 2016).

A sinalização de múltiplas vias pode ser ativada com o excesso de nutrientes para estimular uma resposta inflamatória. Embora os fatores que atraem e/ou ativem células do sistema imune nos tecidos obesos ainda não estejam totalmente entendidos. Além disso, foi demonstrado que células isoladas da medula óssea migraram para o meio de cultura condicionado por explantes de adipócitos de pacientes obesos em resposta aos fatores solúveis liberados (Ito et al. 2008; Ringseis et al. 2015; Tetsuya et al. 2017), mostrando a forte conexão entre tecidos obesos e infiltração celular.

## **1.2– ATIVAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR E PERFIL MACROFÁGICO DURANTE A METAINFLAMAÇÃO**

A obesidade está associada à inflamação crônica caracterizada por progressivo acúmulo de células do sistema imune (por exemplo, macrófagos, células T, células B, eosinófilos e neutrófilos) no tecido adiposo (Boutens e Stienstra et al. 2016; Blaszczak, Jalilvand, and Hsueh 2021). Além de adipócitos, macrófagos foram identificados como um dos principais tipos celulares encontrados neste tecido, sendo também fonte de produção de citocinas e fator chave na progressão da inflamação e resistência à insulina durante a obesidade (Lumeng et al., 2008; Flaherty et al. 2019).

O perfil de polarização de macrófagos do tecido adiposo (ATMs) durante a obesidade, seja pró-inflamatório ou anti-inflamatório (perfil de ativação M1 ou M2, respectivamente), é influenciado por fatores metabólicos (Wentworth et al. 2010; Frieler, Ramnarayanan, and Mortensen 2012; Fjeldborg et al. 2014). Camundongos obesos exibem uma população pró-inflamatória M1 de macrófagos, que por sua vez foram mostrados insensíveis à insulina (Olefsky et al. 2010). As proteínas marcadoras dos ATMs M1 incluem integrina  $\alpha$ M (CD11b), CD40 e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e IL-1 $\beta$  (Haase et al. 2014). Por outro lado, indivíduos eutróficos exibem mais ATMs de perfil de ativação M2 com expressão genética distinto que se caracteriza pela expressão relativamente alta de CD206, arginase-1 e IL-10 (Morris et al., 2011). Não apenas macrófagos, mas também células T natural killer (NKT) estão em maior número no tecido adiposo de camundongos obesos em comparação com eutróficos e podem contribuir para o estado de metainflamação (Liu et al. 2009; Ohmura et al. 2010).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina importante derivada de macrófagos e adipócitos mediador da inflamação, enquanto os ácidos graxos livres são importantes mediadores da inflamação derivados de adipócitos. Mudanças no tecido adiposo durante a inflamação metabólica também incluem expressão em macrófagos de alguns produtos genéticos característicos de



Acredita-se que fenômenos relacionados às interações entre macrófagos e adipócitos, como a metainflamação, migração celular e mudanças nos estágios de polarização, envolvem fatores secretados por adipócitos (FSA) (Zhao et al. 2018; Zhang et al. 2019).

Além da obesidade ser marcada por fenômenos relacionados com interações entre macrófagos e adipócitos como a inflamação metabólica ou metainflamação, a ativação macrofágica por fatores secretados por adipócitos é primordial para induzir estados polarizados de macrófagos. Assim, fatores de transcrição com propriedades imunorregulatórias podem realizar uma função chave em processos inflamatórios e na adipogênese.

### **1.3 – PPAR $\gamma$ E METABOLISMO LIPÍDICO**

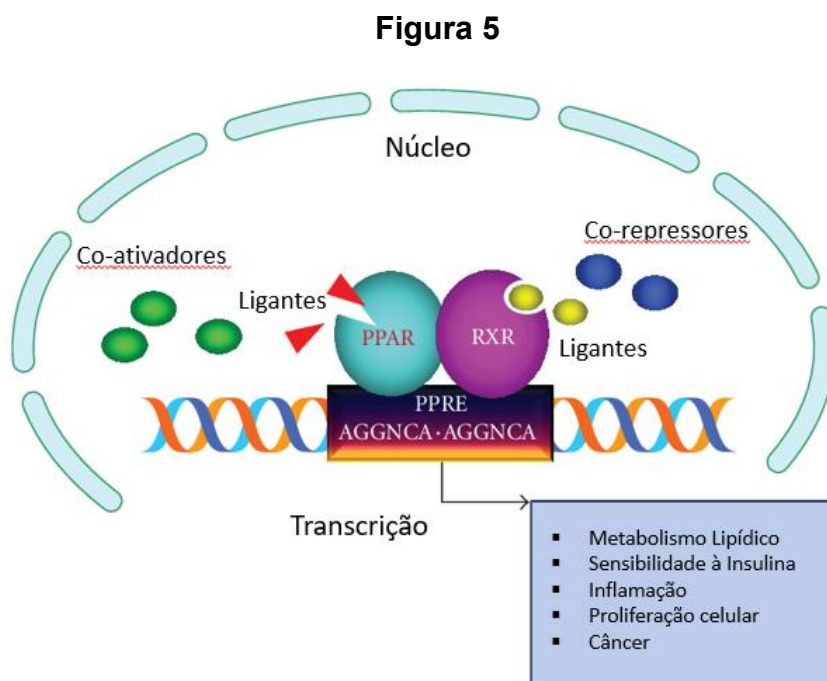
O receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) é um receptor nuclear pertencente a uma superfamília de fatores de transcrição, conhecido por originalmente regular a diferenciação de adipócitos, captação e armazenamento de ácidos graxos, metabolismo lipídico, homeostase da glicose, aterogênese, sensibilidade à insulina, mas também com funções na inflamação, imunorregulação, função neuronal, doenças oculares e cardiovasculares, e em infecções (Desvergne et al. 1999; Rosen et al. 2001; Fajas et al. 2001; Guan et al. 2001; Willson et al. 2001; Koutnikova et al. 2003; Zingarelli, et al. 2003; Knouff et al. 2004; Lehrke et al. 2005; Feige et al. 2006; von Knethen et al., 2007; Tontonoz et al. 2008; Almeida et al. 2009; Antonietta et al., 2012; Monsalve et al. 2013; Almeida et al. 2014; Marion-Letellier et al. 2015).

O PPAR $\gamma$ , foi descrito junto às demais classes de PPARs em adipócitos, monócitos e macrófagos de tecidos diversos, incluindo células espumosas de lesões ateroscleróticas (Ricote et al., 1998; Tontonoz, 1998). Além disso, está presente em outras células como musculares, do epitélio gastrointestinal, osteoblastos e osteoclastos, células do sistema imune de origem hematopoiética, incluindo linfócitos T, linfócitos B, células NK, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, (Zingarelli, et al. 2003; Szatmari et al., 2007; Heikkinen et al., 2007; Tontonoz et al. 2008, Monsalve et al. 2013).

Existem três isoformas de PPAR- $\gamma$  bem identificadas, a saber, PPAR- $\gamma$ 1, PPAR- $\gamma$ 2 e PPAR- $\gamma$ 3, derivadas do mesmo gene (Ricote et al., 1998; Fajas et al. 1998; Fajas

et al. 2000). O PPAR- $\gamma$  difere pela presença de 30 aminoácidos extras na região n-terminal e os transcritos de RNA de PPAR- $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 3 se traduzem na proteína PPAR- $\gamma$ 1 idêntica. PPAR- $\gamma$ 1 é encontrado em uma ampla gama de tecidos; enquanto o PPAR- $\gamma$ 2 é restrito ao tecido adiposo e o PPAR- $\gamma$ 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco (Fajas et al. 1998; He et al. 2003; Ricote et al. 1998; Braissant et al 1996).

A partir da ligação ligante-receptor, o PPAR $\gamma$  se heterodimeriza com o receptor retinóide x (RXR) e se liga a regiões promotoras específicas de genes-alvo no DNA, atuando como fator de transcrição. Nesse processo de ativação, após se heterodimerizarem com o RXR, complexos de proteínas que se constituem de co-ativadores ou co-repressores são recrutados, como o co-ativador 1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) ou proteína E1a de ligação p300 (EP300) contendo atividade de histona acetilase. Uma vez formado, o heterodímero reconhece a região do elemento de resposta PPRE, localizado no promotor do gene alvo, levando à regulação da transcrição gênica. (Figura 5) (Monsalve et al. 2013; Marion-Letellier et al. 2015).



**Figura 5: Sinalização de PPAR $\gamma$ .** O receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e o receptor retinóide X (RXR) pertencem à superfamília dos receptores nucleares. PPAR $\gamma$  é ativado por numerosos ligantes naturais ou sintéticos. Após a ligação a um ligante, PPAR forma um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR) que é ativado por ácido retinóico e recruta co-ativadores. O complexo então se liga à região promotora do elemento de resposta do proliferador de peroxissomo (PPRE), levando à regulação de genes envolvidos principalmente no metabolismo de lipídios e glicose, inflamação e câncer (Marion-Letellier et al. 2015). Adaptado de Jong et al. 2012.

O PPAR $\gamma$  também pode promover a expressão de mediadores anti-inflamatórios no sistema imunológico inato, e reprimir genes inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6) e NO sintase induzível (iNOS), por meio da transrepressão de genes alvos do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa\beta$ ), ativador da proteína 1 (AP-1) e transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição (STAT) (Chen et al., 2014; Jiang et al. 1998; Poynter et al. 1998). Estas observações sugerem a participação de PPARs não somente no metabolismo de lipídios como também no controle da inflamação.

O papel dos PPARs na diferenciação de macrófagos e acúmulo de lipídios intracelular tem sido documentado (Nagy et al., 1998; Tontonoz, 1998). Ligantes específicos de PPAR $\gamma$  potencializam a formação de corpúsculos lipídicos (CL's), são agonistas do fator ativador de plaquetas (PAF) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), juntamente à expressão de CD36 na membrana celular, sugerindo que PPAR $\gamma$  tem um papel fundamental na regulação da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (de Assis et al. 2003; Inazawa et al. 2003).

Já foi relatado que a ativação de PPARs aumenta a transcrição de todos os genes que codificam proteínas da família das perilipinas (antigas proteínas PAT), com exceção da proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons (TIP47). Essas proteínas (perilipina, ADRP, TIP47) podem compartimentalizar ácidos graxos esterificados nos corpúsculos lipídicos, para posterior liberação de ligantes para os PPARs (Wolins e et al., 2013). Além disso, os PPARs podem também controlar a transcrição da ADRP em camundongos e humanos (Edvardsson et al., 2006; Motomura e et al., 2006). Apesar de muitas funções serem propostas para PPAR $\gamma$  em macrófagos, o verdadeiro papel deste fator de transcrição na fisiologia e ativação dos macrófagos não é completamente conhecido e a identidade de ligantes biológicos para PPAR $\gamma$  permanece não esclarecida, sendo esta uma área de investigação intensa.

Além disso, patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG, sobrevivem e replicam no interior de células do sistema imune, como os macrófagos, induzindo um mecanismo de escape que envolve a formação de corpúsculos lipídicos, mediada pela via de sinalização celular do receptor nuclear PPAR $\gamma$ , entre outras atividades (Almeida et al. 2009, Almeida et al. 2014).

## 1.4 – CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

### 1.4.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os Corpúsculos lipídicos (CL)s são organelas citoplasmáticas altamente dinâmicas, com funções ativas no metabolismo e estoque de lipídios para geração de energia, síntese de membrana, síntese de mediadores inflamatórios, sinalização celular, inflamação e implicações no câncer (Beller et al. 2010; Bozza et al. 2007; Farese and Walther 2009). São compostos por lipídios neutros, como triacilglicerol, diacilglicerol e ésteres de colesterol e distribuem-se pelo citoplasma de diversos organismos e tipos celulares, incluindo plantas, fungos e procariotos (Tauchi-Sato et al., 2002; D'Ávila et al, 2006; Bozza et al.2011). O tamanho dos CLs varia de 0,5 µm a 100 µm ou pouco mais, como é o caso de adipócitos que apresentam CLs preenchendo todo o citoplasma da célula (Walther e Farese, 2012). Sua morfologia apresenta certa heterogeneidade a nível ultraestrutural variando de fortemente de elétron-densos a elétron-lúcidos de acordo com o tipo celular e o estado de ativação (Figura 6 A e B), podendo ser corado por corantes específicos para lipídios neutros como Oil Red O e Bodipy (Figura 6 C e D).

Existem algumas limitações metodológicas para o seu estudo e identificação pela microscopia convencional, devido à possibilidade de serem destruídos por fixação e coloração com os reagentes à base de álcool. Os aspectos relacionados à estrutura e função variam de acordo com o tipo de leucócito, estado de ativação e ambiente inflamatório (Melo et al, 2011; Bozza et al., 2007).

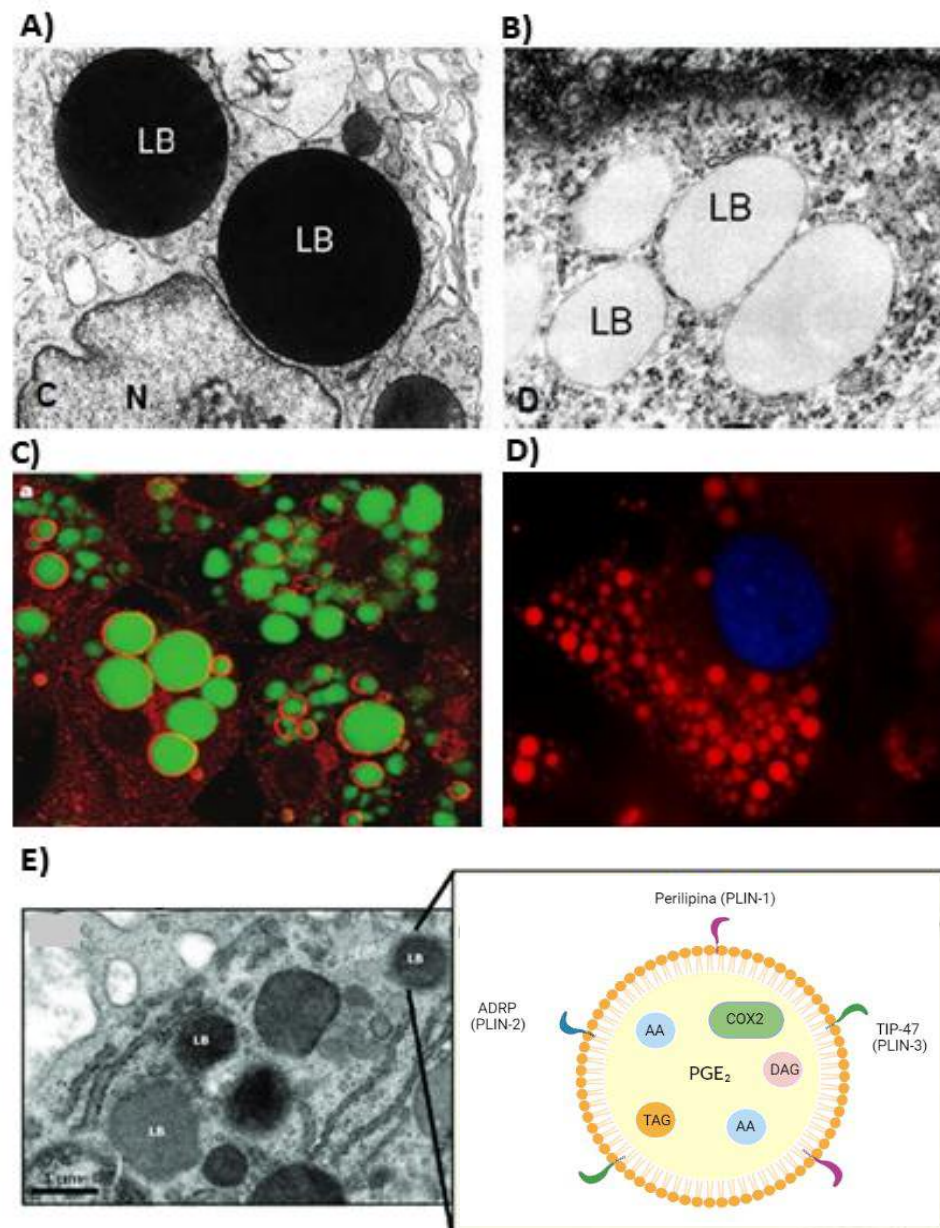
Diferentemente das demais organelas que possuem bicamada lipídica, os CLs são constituídos por uma monocamada de fosfolipídios, que os delimita juntamente a proteínas (Tauchi-Sato et al. 2002). Esta organização única desafia a compreensão de como ocorrem as vias de transporte de proteínas e lipídios, uma vez que o arranjo não se encaixa nos mecanismos clássicos de transporte vesicular. Por outro lado, favorece a sua distinção de outras organelas sob o microscópio eletrônico de transmissão (Melo et al. 2011).

Vários tipos de lipídios foram identificadas nos CLs, presentes em maiores ou menores quantidades. Em adipócitos, os triacilgliceróis (TAGs) são largamente dominantes, enquanto em macrófagos espumosos, colesterol ésteres são mais abundantes (Bartz et al., 2007; Grillitsch et al., 2011). Uma variada gama de proteínas



está associada à superfície dos CLs através de porções moleculares de natureza anfipática e outras foram detectadas no seu núcleo lipídico hidrofóbico (Boulant et al., 2006; Bussell e Eliezer, 2003). O grupo mais abundante e bem caracterizado de proteínas associadas com os CLs são as da família das perilipinas e, por conseguinte, são frequentemente utilizados como marcadores moleculares destas organelas (Brasaemle et al. 2007) (Figura 6 E).

Figura 6



**Figura 6: Morfologia dos Corpúsculos Lipídicos.** As micrografias eletrônicas mostram a heterogeneidade dos CLs, variando de fortemente (A) elétron-densos a (B) elétron-lúcidos de acordo com o tipo celular e o estado de ativação. Adaptados de (Melo et al., 2011). (C) Corpúsculos lipídicos em adipócitos. Adipócitos 3T3-L1 foram estimulados para induzir lipólise e depois marcados para Rab18 (vermelho) e lípidos neutros (verde). Rab18 é recrutado especificamente para a superfície de um subconjunto de corpúsculos lipídicos (CLs). A barra de escala representa 10  $\mu$ m (Adaptado de Parton e Martin, 2014). (D) Adipócito marcado com Oil Red O, corante específico para CLs, e DAPI, corante específico para núcleo. Aumento de 100x (autoria própria). (E) Ampliação da representação esquemática da composição estrutural de um LB. Objetos coloridos representam proteínas ligadas à superfície de LBs localizadas na monocamada de fosfolípidios. PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; AA, ácido araquidônico; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilgliceróis e CE, ésteres de colesterol são encontrados no núcleo de lípido neutro (Almeida et al. 2018).

As principais proteínas pertencentes à família das perilipinas descritas relacionadas aos CLs compreendem as perilipinas (PLIN 1), que constituem o conteúdo protéico da organela e têm sido relacionadas na montagem, estocagem, biogênese e metabolismo dos CLs, ADRP (Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos – atualmente denominada PLIN 2), TIP47 (Proteína de interação de porção terminal de 47kDa – PLIN 3), além de S3-12 (PLIN 4) e oxPAT (Arrese et al. 2014; Mahajan et al, 2015).

A perilipina é a proteína mais abundante em CLs de adipócitos e atua regulando mecanismos de lipólise. Em condições basais, a perilipina protege os CLs da ação das lipases, mas em resposta à estimulação hormonal, como glucagon e epinefrina, esta proteína é fosforilada por proteína cinase A (PKA) dependente de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e recruta lipases sensível a hormônios, dentre outras lipases para os CLs, permitindo o acesso destas enzimas ao seu substrato promovendo a lipólise (Tansey et al., 2008). As perilipinas também são marcadores de diferenciação de adipócitos, nos quais a expressão de seu gene é controlada via PPAR $\gamma$  (Bickel et al. 2009). A ADRP tem funções na incorporação e acúmulo de lipídios em diferentes tipos de células (Brasaemle et al., 1997). TIP47 foi originalmente identificada como uma proteína envolvida no tráfego de membrana a partir da rede trans do Golgi. Por existir em outros compartimentos subcelulares, mas ser rapidamente recrutados após estímulo lipogênicos, TIP47 foi denominada proteína permutável associada aos CLs (Wolins et al., 2001).

Outras proteínas também fazem parte do conteúdo protéico dos CLs, como as hidrolases que se ligam ao nucleotídeo guanosina trifosfato (GTPases) da família RAB, consideradas reguladoras chave do tráfego vesicular e da interação entre organelas. A Rab18 é recrutada para CLs após a estimulação de lipólise por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, e a expressão de Rab18 aumenta o envolvimento da membrana do retículo endoplasmático (RE) em torno de CLs. A Rab18 associa-se à superfície de CLs, recrutando os efetores ainda não identificados que facilitam a aproximação das superfícies das membranas (Brasaenle et al., 2004). Isso permite a transferência de lipídios entre as camadas de fosfolípidos e associações com elementos do citoesqueleto (Brasaenle et al., 2004). Moléculas envolvidas na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios, como ciclooxigenases (COX) e prostalandinas (PGE's) foram detectadas em CLs de diferentes tipos celulares sob diferentes condições (Bozza et al., 1997).

Com os estudos de proteômica de corpúsculos lipídicos isolados, o número de proteínas identificadas aumentou bastante (Hodges e Wu, 2010). Muitas delas estão envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios. Os CLs compartimentalizam enzimas como acetil-CoA sintetase, acetil-CoA carboxilase, esqualeno epoxidase, lanosterol sintase, triglicerídeo lipase, álcool desidrogenase, dentre outras (Brasaemle et al., 2004; Fujimoto et al., 2004; Wan et al., 2007). Além disso, foram identificadas proteínas relacionadas ao transporte vesicular, fusão de membranas e de associação ao citoesqueleto (Rabs), fator de ribosilação de ADP (ARF), pequenas GTPases e caveolinas, o que sugere que os corpúsculos lipídicos possam sofrer eventos de fusão e fissão, além de poder interagir com outras organelas (Jing et al. 2011; Bartz et al., 2007; Fujimoto et al., 2001; Hodges e Wu, 2010).

#### **1.4.2 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS**

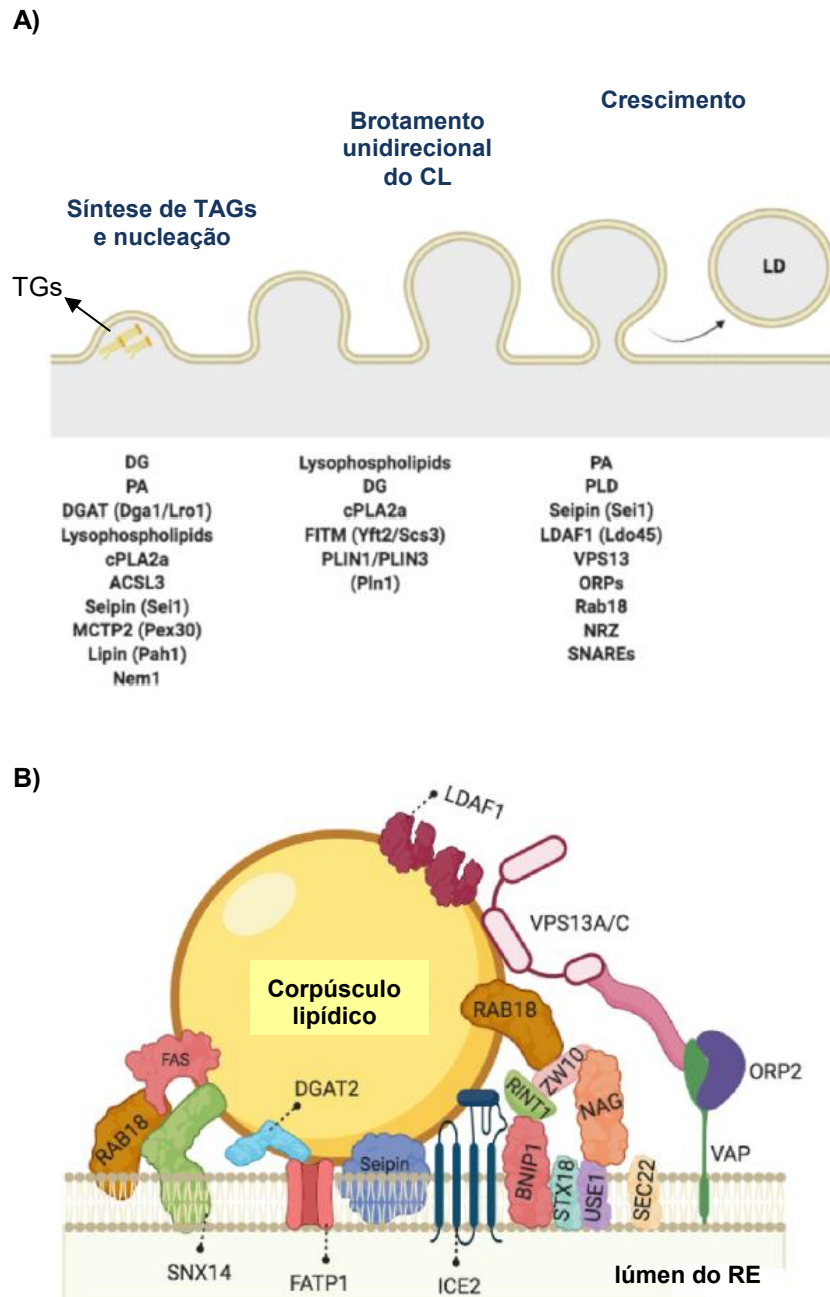
Existem diferentes modelos propostos para a biogênese de CLs, envolvendo transferência de lipídios e proteínas do retículo endoplasmático (RE); no entanto, os mecanismos precisos envolvidos continuam a ser elucidados. Um dos modelos já descritos se dá a partir do RE, onde ocorre um acúmulo de lipídios neutros (LNs) nos folhetos citoplasmático e luminal (Murphy et al. 1999; Robenek et al., 2004; Martin e Parton, 2006; Bozza et al, 2009; Walther, Chung, and Jr 2017; Joshi et al. 2018; Chapman et al. 2019; Guan et al. 2020; Qian et al. 2020; Santinho et al. 2020; Sui et al. 2020; Thiam and Ikonen, 2020; Rakotonirina-Ricquebourg, Costa, and Teixeira 2021). Os lipídios neutros mais abundantes em eucariotos são triacilgliceróis (TGs) e ésteres de esterol e as principais enzimas que os geram em mamíferos são a diacilglicerol (DAG), a diacylglycerol O-acetiltransferase 1 (DGAT1) e a acil-coenzima A: colesterol aciltransferase 1/esterol O-aciltransferase 1 (ACAT1/SOAT1), pertencente à superfamília de O-acil transferase ligada à membrana (Qian et al. 2020; Sui et al. 2020; Guan et al. 2020). Os LNs se difundem na bicamada do RE, e quando sua concentração atinge um nível crítico, uma condensação espontânea de LNs por separação de fases pode ocorrer, levando à formação de uma bolha de óleo dentro da região da bicamada hidrofóbica: esta é a primeira etapa de montagem CL é denominada “nucleação” (Thiam and Ikonen, 2020). A segunda etapa é o crescimento: seguindo os princípios de nucleação, a bolha de óleo deve crescer,

adsorvendo mais LNs para se tornar um CL, ou reabsorver. A terceira etapa compreende o brotamento de um CL esférico no citosol. Esta etapa requer a manutenção dos fosfolipídios e uma cobertura de proteína específicas na monocamada citosólica. Tal assimetria garante que o folheto citosólico permaneça com baixa tensão superficial, promovendo o surgimento do CL nesta direção. A quarta etapa é provavelmente uma estabilização feita por proteína dos contatos CL-RE ou um destacamento potencial do CL da bicamada RE. Em ambos os casos, os CLs permanecem intimamente ligados à bicamada ER por várias proteínas de interação (Thiam and Ikonen, 2020) (Figura 7).

Quando formados, os CLs são suscetíveis a aumentar seu volume, tanto por síntese localizada de lipídios (Kuerschner et al., 2008) como por fusão (Olofsson et al., 2009). A identificação de proteínas que atravessam a membrana permeando o centro dos CLs, tais como caveolinas e ciclooxygenases (Bozza et al., 1997; Dvorak et al., 1992; Fujimoto et al., 2001) associado à visualização de estruturas membranosas ou membranotubular dentro dessas organelas, levaram à formulação de uma nova teoria chamada de "o modelo de englobamento", que propõe que o CL em formação incorporam projeções de membrana do RE, de ambos os folhetos, citoplasmática e luminal (Bozza et al., 2009).

Proteínas e fatores regulatórios distintos, que se localizam em regiões de contato com a membrana, estão envolvidos não apenas na troca e transporte de lipídios inter-organelares, mas também funcionam em outros processos celulares importantes, incluindo autofagia, dinâmica mitocondrial e herança, sinalização iônica e inter-regulação (Rakotonirina-Ricquebourg, Costa, and Teixeira 2021; Renne and Hariri 2021). Locais de contato entre membranas funcionam como centros metabólicos cruciais que controlam a ocorrência de reações químicas, levando à síntese de organelas, como os CLs, compartimentação de metabólitos para fins de eficiência energética, homeostase celular, biossíntese de membrana, regulação da divisão e biogênese de organelas e crescimento celular (Rakotonirina-Ricquebourg, Costa, and Teixeira 2021; Renne and Hariri 2021). CLs podem estabelecer contatos extensos com muitas organelas, incluindo o RE, que possui estruturas amplamente interdependentes que podem se comunicar com outras organelas por meio de contato entre membranas, apoiando a troca de lipídios, transporte de íons e até mesmo distribuição e divisão de organelas (Figura 7 B) (Haoxi Wu, Pedro Carvalho and Voeltz 2018; Choudhary and Schneider 2021; Cottier and Roger Schneider et al.

Figura 7



**Figura 7: Biogênese dos Corpúsculos Lipídicos:** (A) A síntese a partir do retículo endoplasmático (RE) ocorre através da atividade das proteínas DGAT. TGs (triglicerídeos). Durante a nucleação, óleos, Seipin, FITM, MCTP2, ACSL3, Nem1, lipina, DGAT e cPLA2 $\alpha$  medeiam a remodelação lipídica local envolvendo ácido fosfatídico, diacilglicerol e lisofosfolípídios. Proteínas cPLA2 $\alpha$ , FITM, PLIN1e PLIN3, lisofosfolípídios e diacilglicerídeos são necessários para o brotamento e emergência dos CLs. Vários fatores contribuem para a expansão e crescimento dos CLs, como fosfolipase D, VPS's, ORPs, seipina, LDAF1 e PA. A linha amarela representa a monocamada do CL. Adaptado de (Rakotonirina-Ricquebourg, Costa, and Teixeira 2021). (B) Proteínas de amarração, associadas a regiões de contato CL-RE. **Seipina** contribui para a marcação de locais para formação do CL e brotamento. Uma vez que

o TG se acumula acima de um certo limite, LDAH1 dissocia e redistribui para a superfície do CL. Rab18 ligado a GTP contribui para reunir as duas organelas. ORP2 associado a VAP também é necessário para a interação. DGAT2 e FATP1 provavelmente contribuem com a síntese e acúmulo de TG no contato CL-RE. ICE2 é ancorado no RE e interage com CLs. Snx14 medeia a interação via seu domínio de nexina C-terminal (CN). VPS13A/C interage com o RE via VAP usando seu motivo FFAT. Outras proteínas que participam da interação estão exemplificadas na figura. Adaptado de Rakotonirina-Ricquebourg, Costa, and Teixeira 2021.

A formação de CLs durante o processo inflamatório é um evento altamente controlado e dependente de vias sinalização e estímulos. Prostaglandina D2 (PGD2) um potente agente quimiotático de leucócitos, induz a biogênese de CLs via receptor acoplado à proteína G em eosinófilos, mas não em macrófagos. O PAF, através de seu receptor, induz formação de CLs em neutrófilos e eosinófilos (Bozza et al., 2005, Bozza et al., 2009), e as quimiocinas eotaxina (CCL11) e RANTES (CCL5), via receptores CCR3, estimulam formação de CLs em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001). Durante as infecções por *Mycobacterium bovis* BCG e por *T. cruzi*, a formação de corpúsculos lipídicos tem mostrado ser dependente do receptor semelhante ao receptor *Toll Like 2* (TLR2), mas não TLR4 (D'Avila et al., 2011, Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006). Além disso, estudos com *Mycobacterium leprae* em pacientes com lesão em neuronios durante a hanseníase demonstraram a capacidade de *M. leprae* para induzir e recrutar CLs para fagossomos contendo bactérias. A exclusão de TLR6, mas não o TLR2, aboliu completamente a biogênese de CLs por *M. leprae*, além de inibir a absorção bacteriana em células de Schwann infectadas, indicando um papel crítico para a sinalização dependente de TLR6 nas interações de *M. leprae* e a células hospedeira, o que favorece a fagocitose e subsequente sinalização para indução de biogênese de CLs em células infectadas. A biogênese de CLs induzida por *M. leprae* foi correlata com o aumento da secreção de PGE<sub>2</sub> e IL-10, bem como redução da produção de IL-12 e NO em células de Schwann infectadas por *M. leprae*. A análise de nervos de pacientes com hanseníase mostrou colocalização de *M. leprae*, CLs e ciclooxigenase-2 nas células, indicando que corpúsculos lipídicos são sítios para síntese de PGE<sub>2</sub> *in vivo*. Estes dados reforçaram o papel das CLs favorecendo a sobrevivência e persistência de micobactérias na célula hospedeira e suportam um papel crítico dos corpúsculos lipídicos na patogênese micobacteriana (Mattos K. A. et al. 2010; Mattos K. A. et al. 2012).

Além da produção de eicosanoides, os CLs podem desempenhar outros papéis durante as desordens inflamatórias ou em resposta a infecções por

compartimentalizar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em leucócitos ativados. A primeira citocina detectada nos CLs foi o TNF- $\alpha$ , a partir de imunomarcção ultraestrutural em biópsias de pacientes com doenças de Crohn (Beil et al., 1995). Posteriormente esta mesma citocina foi detectada em CLs de leucócitos derivados de pacientes sépticos (Pacheco et al., 2002).

O envolvimento de receptores celulares relacionados ao reconhecimento de patógenos que desencadeiam a biogênese de corpúsculos lipídicos tem sido documentada por nosso grupo, sendo os TLRs os mais amplamente estudados (D'Avila et al., 2006; D'Avila et al., 2008; Almeida et al., 2014; Almeida et al., 2009). TLR4 foi demonstrado ter relação na biogênese dos corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados por lipopolissacarídios (LPS) de bactérias gram-negativas (Pacheco e cols., 2002). Esse receptor atua como uma molécula de reconhecimento primário para LPS de bactérias gram-negativas. LPS necessita que o receptor TLR4 se heterodimerize com o receptor (MD2), formando um complexo de sinalização, para uma eficiente ativação (Pacheco e cols., 2002).

Os lipídios são as principais moléculas efetoras que influenciam na fisiologia de células hospedeiras de bacilos intracelulares, modulando seu metabolismo e sua resposta imunológica (Tanigawa et al. 2021). Estudos anteriores demonstram que patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG pode induzir um mecanismo de escape regulando uma das diferentes vias de sinalização celular na formação do CL dentro dos leucócitos – a via do receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Almeida et al. 2009, Almeida et al. 2014; Tanigawa et al. 2021). Entretanto, os mecanismos referentes à ativação de PPAR $\gamma$  e metabolismo lipídico perante a ativação de macrófagos por fatores secretados por adipócitos, não estão esclarecidos. Além disso, a interação entre macrófagos e adipócitos é um processo complexo e, poucos estudos têm focado desvendar o *cross-talk* entre as células e sua relação com reposta inflamatória e metabolismo lipídico frente a condições patológicas diversas, como por exemplo, infecções por patógenos intracelulares, havendo, portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados.



## 1.5 – ATIVAÇÃO MACROFÁGICA E INFECÇÃO MICOBACTERIANA

A modulação do metabolismo lipídico juntamente ao papel fundamental da ativação de PPAR $\gamma$  na formação de CLs e resposta imune do hospedeiro, são eventos importantes induzidos por micobactérias para a persistência, sucesso e estabelecimento das infecções micobacterianas.

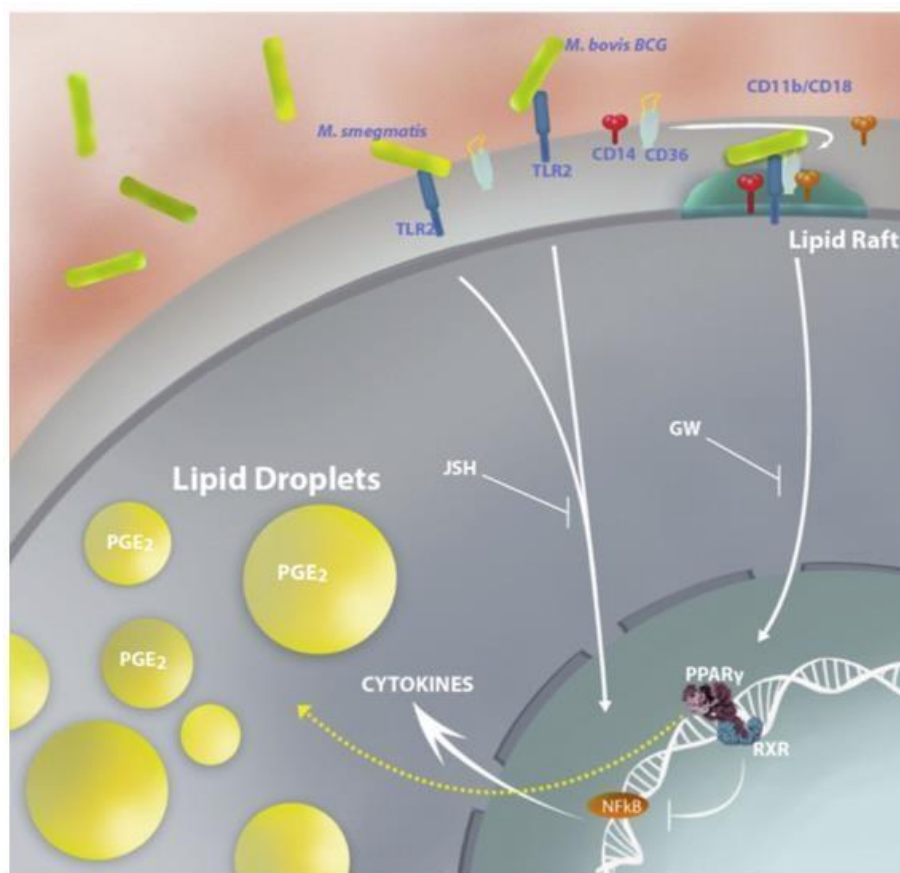
*Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da Tuberculose (TB), é um patógeno intracelular que sobrevive e replica dentro de células do sistema imune do hospedeiro, especialmente macrófagos. A capacidade de *M. tuberculosis* em adaptar-se ao ambiente hostil dentro de macrófagos tem sido fundamental para o seu sucesso como patógeno. As micobactérias podem subverter a resposta imune do hospedeiro interferindo em vias de sinalização, vias metabólicas e na expressão de fatores de transcrição, modulando eventos endossomais/fagossomais e criando um nicho para sua sobrevivência (Rajaram et al., 2010).

A transmissão da doença acontece a partir da inalação de pequenas partículas suspensas no ar contendo o patógeno, o qual pode permanecer no ambiente por minutos ou horas após expectoração de pessoas com tuberculose pulmonar ou laringeal durante tosse, espirro, fala, etc. (Riley et al., 1995). A partir da entrada pelas vias respiratórias, o patógeno atinge os pulmões, onde estabelece o foco primário (Moreno e cols., 1989). Em muitos casos a infecção é assintomática, e a latência clínica pode se estender por toda vida do indivíduo. No pulmão, o microrganismo pode levar a quatro possíveis respostas: 1 - resposta inicial do hospedeiro pode ser efetiva e eliminar os bacilos, impedindo o estabelecimento da doença; 2 – as micobactérias podem ser inativadas, permanecendo dormentes no interior dos fagócitos, não havendo o desenvolvimento da doença; 3 – a micobactéria pode iniciar a multiplicação imediatamente após a infecção ocasionando a tuberculose primária; ou 4 – ocorre reativação da infecção latente, (Flynn and Chan, 2001).

O *M. tuberculosis* (Rajaram et al., 2010) e o *M. bovis* induzem a formação de corpúsculos lipídicos mediante sinalização via TLR-2 (D'Avila et al., 2006.; Almeida et al. 2009, Almeida 2014) e CD36 (Almeida et al., 2014), ativando a via do PPAR $\gamma$  (Almeida et al, 2014). A cooperação CD36-TLR2, associação com CD11b e CD14, e compartimentação de sinalização dentro de “*lipid-rafts*” desvia o sinal de resposta do hospedeiro com aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$  através de caminhos

independentes de NF- $\kappa$ B, levando ao aumento do acúmulo de CLs em macrófagos e a modulação da resposta imune (Almeida et al. 2014) (Figura 8).

**Figura 8**



**Figura 8: TLR2 / CD36 desviam a sinalização intracelular para o aumento da expressão de PPAR $\gamma$  e acumulação de lipídios durante a infecção por *M. bovis* BCG (Adaptado de Almeida et al. 2014).** Infecção por *Mycobacterium bovis* BCG desencadeia diferentes cascatas de sinalização intracelular dependentes de TLR2 com ativação PPAR $\gamma$  e NF- $\kappa$ B. A cooperação CD36-TLR2 e compartimentação de sinalização dentro de lipid rafts, com a participação dos CD14 e CD11b / CD18, desvia a sinalização de resposta do hospedeiro com aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$  através de caminhos independentes de NF- $\kappa$ B, levando ao aumento da acumulação de lipídeos nos macrófagos e redução da modulação da resposta dos macrófagos.

O aspecto espumoso observado em células enriquecidas em corpúsculos lipídicos também é observado na infecção por *M. leprae* podendo representar uma estratégia intracelular micobacteriana eficaz para adquirir lipídios e modular a resposta imune a fim de favorecer a sobrevivência bacteriana (de Mattos K. A., et al. 2012). No entanto, a ativação de macrófagos *in vitro* com *M. smegmatis*, ou Pam3CSK4, ambos potentes ligantes de TLR2, não induziu a biogênese de CLs em macrófagos,

sugerindo que TLR2 sozinho não é suficiente e que os co-receptores associados a TLR2 estão envolvidos no reconhecimento bacteriano e podem ser responsáveis pelo recrutamento de moléculas de sinalização importantes para expressão de PPAR $\gamma$  e formação de corpúsculos lipídicos (Almeida et al. 2014).

Através da modulação da resposta de macrófagos e/ou de aquisição de nutrientes (lipídios), as micobactérias patogênicas criam um mecanismo de escape, que favorece a sobrevivência e replicação nas células do hospedeiro. Macrófagos que acumulam grandes quantidades de corpúsculos lipídicos são chamados de macrófagos espumosos e vários trabalhos têm caracterizado a presença destes macrófagos durante infecções micobacterianas (Almeida et al, 2009; Almeida et al. 2014; D'Avila et al, 2008; Melo et al., 2003), principalmente em granulomas formados durante a tuberculose, tanto em condições clínicas quanto experimentais (Cardona et al., 2000).

Além disso, Vesículas Extracelulares tem sido documentadas como indutoras da formação de corpúsculos lipídicos, com participação na modulação do sistema imune do hospedeiro (D'Avila et al., 2021). Essas micropartículas, delimitadas por uma bicamada lipídica, são liberadas no espaço extracelular, podendo exercer respostas a distância (Van Niel et al., 2018; Witwer e Théry, 2019) e participar de interações parasito-parasito e parasito-hospedeiro (Mantel e Marti, 2014; Gonçalves et al., 1991; Nogueira et al., 2015, 2020).

Em infecções por *Trypanosoma cruzi*, um mecanismo potencial da persistência da parasitemia é a liberação de VEs pela cepa Y (VE Y), que participa da comunicação intracelular por transportar moléculas funcionais que sinalizam às células do hospedeiro e podem modular a resposta imune por meio da indução da formação CLs (Lovo-Martins et al. 2018; D'Avila et al. 2021). Em macrófagos cultivados *in vitro*, o estímulo com VE Y resultou em um aumento da internalização do parasito, aumento da liberação de tripomastigotas infectantes por essas células, além da formação de corpúsculos lipídicos e produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), mesmo na ausência de *T. cruzi*. Em macrófagos infectados, VE Y diminuiu a produção de PGE<sub>2</sub> e citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 24 horas após a infecção, sugerindo que as VEs Y modulam a resposta do hospedeiro a favor do parasito e indica um papel dos corpúsculos lipídicos e da PGE<sub>2</sub> na modulação imunológica exercida por EVs (Lovo-Martins et al. 2018). A inoculação de VE Y em camundongos antes da infecção por *T. cruzi* resultou em um aumento da parasitemia, aumento do parasitismo cardíaco, diminuição do óxido nítrico

(NO) plasmático, redução da produção de NO pelas células do baço e modulação da produção de citocinas, com redução do TNF- $\alpha$  no plasma e diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelas células do baço de animais infectados (Lovo-Martins et al. 2018).

Macrófagos J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* H37Rv liberam VEs que diferem em tamanho e conteúdo de fosfatidilserina das VEs espontaneamente liberados (S-EV), e essas VEs também tiveram efeitos biológicos diferentes: o S-VE reduziu a carga micobacteriana e a produção de citocinas *in vitro* (através de um mecanismo dependente de fosfatidilserina), enquanto os dois tipos de VEs reduziram a carga bacteriana pulmonar *in vivo*. Esses resultados são a base para novas experiências para avaliar se as VEs podem melhorar a eficiência do tratamento convencional para tuberculose, pois este dura pelo menos seis meses e tem efeitos adversos. Portanto, é importante encontrar alternativas terapêuticas que reduzam a carga bacteriana e possam reduzir a duração do tratamento (García-Martínez et al. 2019).

Assim, além do papel imunoregulador de PPAR $\gamma$  nas infecções micobacterianas e inflamação, VEs envolvidas no *cross-talk* entre macrófagos e adipócitos, também podem participar da sinalização entre essas células e favorecer, ou não, o mecanismo de evasão imunológica das micobactérias (Akbar et al. 2019; Kim, Shah, and Nakamura 2018; Pardo et al. 2018; Mirza, Althagafi, and Shamshad 2019; Hamaguchi and Sakaguchi 2012).

## **1.6 – VESÍCULAS EXTRACELULARES**

### **1.6.1 – CARACTERIZAÇÃO**

Durante a última década, observou-se uma crescente importância nos estudos sobre vesículas extracelulares como mediadoras da comunicação intercelular (Record et al. 2018; Mathieu et al. 2019; Tkach and Théry 2016; Raposo and Stoorvogel 2013). Há um crescente número de publicações sobre VE's em periódicos de alto nível, propondo papéis importantes em inúmeras vias fisiológicas, no envelhecimento, câncer, doenças infecciosas e complicações da obesidade, de forma que a pesquisa nessa área tem gerado amplo interesse e entusiasmo (Camino et al. 2020; Becker et al. 2016; Hill 2019; El Andaloussi et al. 2013; O'Brien et al. 2020; Jayabalan et al. 2017;

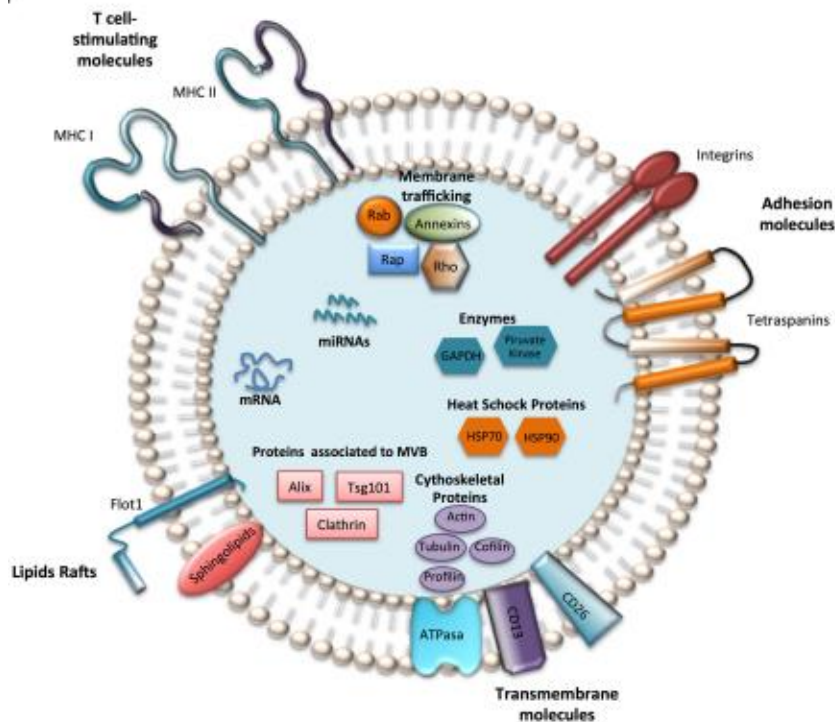
Gao, Salomon, and Freeman 2017).

Assim, recentemente, a sociedade internacional de vesículas extracelulares (ISEV) define o conceito “vesícula extracelular” (VE) como o termo usado para definir partículas naturalmente liberadas pela célula, que são delimitadas por uma bicamada lipídica e que não podem se replicar, ou seja, não contêm um núcleo funcional. Dentre as subpopulações de VE's, destacam microvesículas, formadas a partir da membrana plasmática; exossomos, originados de um compartimento intracelular; e corpos apoptóticos, vesículas heterogêneas conhecidas por serem liberadas de células submetidas à processos de morte celular programada apoptótica (van der Pol et al. 2012; Kalra et al. 2016; Record et al. 2018; Théry et al. 2018).

O uso de termos operacionais para se definir os subtipos de VE's são usados pelos autores considerando: a) características físicas das VE's, como tamanho (“VE's pequenas” – p e “VE's médias / grandes” – m/g) com intervalos definidos (por exemplo, <100nm (pequeno) ou <200nm (médio) ou > 200nm (grande)); ou densidade (baixa, média, alta); b) composição bioquímica (CD63, CD81, anexina V, etc.); ou c) descrições da célula de origem (VE's de adipócitos, VE's de podócitos, VE's hipóxicos, oncossomas grandes, corpos apoptóticos) (Thery et al. 2009; Record et al. 2014; Kowal et al. 2016; Théry, C. et al. 2018) (Figura 9).

Microvesículas (MV's), são pequenas vesículas cobertas por membrana (100-1000 nm) derivadas de muitos tipos diferentes de células em condições normais e fisiopatológicas (Thery et al., 2002). Muitas células podem liberar MV's, incluindo monócitos/macrófagos (Akao et al., 2011), adipócitos (Eguchi et al., 2015), reticulócitos (Pan et al., 1983), células B (Raposo G. et al., 1996), células T (Blanchard N., 2002), células dendríticas (Thery C. et al. 1999), mastócitos (Raposo G. et al., 1997), células epiteliais (van Niel et al., 2001; Oshima K. et al., 2002) e células tumorais (Poste G. et al., 1980; Mears R. et al. 2004). Apesar de já terem sido tratadas como restos celulares inertes, atualmente as MV's são reconhecidas como importantes mediadoras da comunicação intercelular (Vojtech et al., 2014), estando associadas com múltiplos fatores angiogênicos, exibindo assim atividade angiogênica *in vitro* e *in vivo* (Aoki, N. et al. 2010; Ogawa, R. 2010).

Figura 09

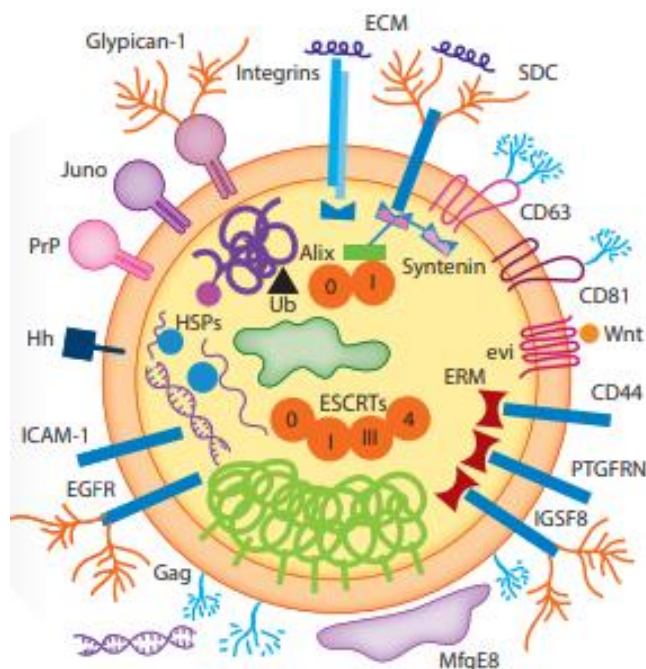


**Figura 09: Exemplo ilustrativo da heterogeneidade na composição de microvesículas.** A figura demonstra um exemplo da composição de microvesículas derivadas de células mesenquimais (MSCs), contendo uma variedade de componentes bioativos. Conforme descrito em outras células, as vesículas de MSCs contêm vários fatores de crescimento, citocinas, lipídios, proteínas, mRNAs, microRNAs precursoros (pre-miRNAs), microRNAs (miRNAs), RNA de transferência, dentre outras (Merino-González et al. 2016).

Enquanto isso, exossomos são vesículas derivadas da membrana endocítica, de tamanho entre 30-150 nm, o que varia significativamente, mesmo para exossomos secretados de uma única linha celular (Pegtel and Gould et al., 2019). Uma extensa variedade de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios já foram propostos como moléculas carregadas por exossomos que, por sua vez, estão presentes em muitos e talvez em todos os fluidos corporais. Um grupo significativo da literatura demonstrou que os constituintes moleculares dos exossomos, especialmente proteínas exossômicas e microRNAs (miRNAs), são muito promissores como novos biomarcadores para diagnóstico clínico (Lin et al. 2015; Yu, Odenthal, and Fries 2016) (Figura 10). Flaherty e colaboradores demonstraram que adipócitos liberam vesículas extracelulares do tamanho de exossomos contendo lipídios que entram em uma via endocítica em

ATMs. Esse mesmo grupo identificou em exossomos derivados de adipócitos, uma “gota de lipídio” e suas proteínas associadas, incluindo ATGL e PLIN1, consistente com corpúsculos lipídicos (Flaherty et al. 2019). Tornou-se aparente que os exossomos são enriquecidos por um subconjunto distinto de proteínas derivadas de células, ácidos nucleicos, lipídios e glicoconjugados, enquanto microvesículas maiores assemelhava-se mais à composição da célula (Pegtel and Gould 2019).

**Figura 10**



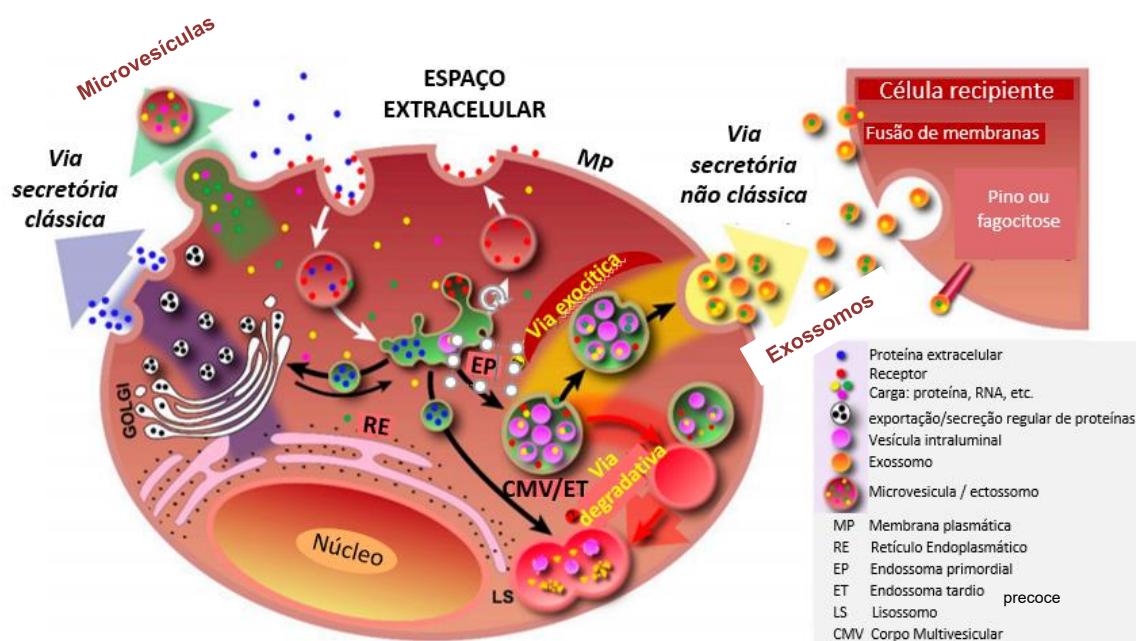
**Figura 10: Exemplo ilustrativo da heterogeneidade da composição dos exossomos.** Exossomos são ricos em tetraspaninas, moléculas de adesão, enzimas, proteínas de ligação a RNA, RNAs, DNAs e glicanos complexos. Abreviações: ECM, extracellular matrix; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERM, ezrin-radixin-moesin; ESCRTs, endosomal sorting complexes required for transport; Gag, retroviral Gag proteins; Hh, Hedgehog; HSP, heat shock protein; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; IGSF8, immunoglobulin superfamily member 8; MfgE8, milk fat globule protein E8; PrP, prion protein; PTGFRN, prostaglandin F2 receptor negative regulator; SDC, syndecan; Ub, ubiquitin; Wnt proteins, wingless proteins.

É importante ressaltar que tanto os exossomos quanto as microvesículas carregam moléculas funcionais capazes de modificar o fenótipo do receptor células (Camino et al. 2020; van der Pol et al. 2012). Os exossomos são preferencialmente endocitados e podem liberar seu conteúdo por fusão com o receptor endossômico por



um processo chamado *back-fusion*. Mesmo que algumas microvesículas sejam internalizadas por endocitose mediada por receptor bis monoacilglicerol fosfato (BMP), sua membrana é desprovida deste receptor. Assim, a fusão entre microvesículas e a membrana plasmática celular pode representar o mecanismo preferencial de transferência de material para as células receptoras (Kalra, Drummen, and Mathivanan 2016; Record et al. 2018) (Figura 11).

**Figura 11**



**Figura 11: Vias envolvendo a formação de microvesículas e exossomos (Adaptado de Kalra et al. 2016).** Na via secretória clássica, vesículas com carga protéica, empacotadas no aparelho de Golgi, transportam sua carga para a membrana plasmática (MP). Ao se fundir com a MP, as proteínas de membrana e as proteínas secretoras são transportadas efetivamente aos destinos pretendidos. Vários tipos de carga, por exemplo, proteínas, RNA, também podem ser transportadas no espaço extracelular via brotamento externo da MP com formação de microvesículas (ectossomos). A carga é absorvida pela célula via endocitose (captação mediada por receptores) e endossomas precoces. Nos endossomas iniciais, as proteínas são recicladas para a MP ou sequestradas em vesículas intraluminais (VIL) dos CMVs. A formação de exossomos começa com a brotação interna da membrana do endossoma precoce e subsequente formação de corpos multivesiculares (CMVs). Na via exocítica 1, CMVs se fundem com a MP para liberar seu conteúdo (exossomos) no espaço extracelular. Na via degradativa 2, os CMVs são enviados para lisossomos para degradação por enzimas. A carga exossômica é entregue para a célula receptora por vários mecanismos como fusão de membranas, pinocitose / fagocitose ou ligação ligante-receptor.

### 1.6.2 – PAPEL DAS MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ADIPÓCITOS E MACRÓFAGOS E EM INFECÇÕES INTRACELULARES

Exossomos e microvesículas circulam em todos os fluidos biológicos e podem



desencadear respostas biológicas à distância. Seus efeitos incluem uma grande variedade de processos biológicos, como modificação do microambiente tumoral (Gangoda et al. 2015), vigilância imunológica ou regulação da inflamação (Théry et al. 2002; Cossetti et al. 2014; Sicco, C. L. 2017; Record, et al. 2018), atividade antimicrobiana em fagócitos (Oliveira et al., 2010), efeitos protetores em doenças neurodegenerativas e câncer (Gangoda et al. 2015; Clement et al. 2020), além de um papel como carreadoras de fatores de virulência (Rodrigues et al., 2008) e anticorpos em infecções fúngicas (Albuquerque et al., 2008; Vargas et al., 2015; Gil-Bona et al., 2015). As vesículas extracelulares podem transportar uma grande variedade de moléculas ativas, incluindo mediadores lipídicos como eicosanóides, proteínas e ácidos nucleicos, capazes de modificar o fenótipo das células receptoras (Record, et al. 2018; Camino et al. 2020; Bauer, Round, and O'Connell 2021).

VE's e suas subpopulações, liberadas por adipócitos humanos ou por explantes de tecidos adiposos, desempenham um papel na interação parácrina entre adipócitos e macrófagos, um mecanismo chave na inflamação do tecido adiposo que leva a complicações metabólicas (Pardo et al. 2018; Camino et al. 2020; Akbar et al. 2019; Kim, Shah, and Nakamura 2018).

As vesículas adipocíticas diferenciam monócitos em macrófagos característicos de tecido adiposo, definidos pela liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (Mariette et al. 2013). MV's podem contribuir para a infiltração de macrófagos associada à obesidade, a partir da indução de uma mudança de polarização macrofágica (Eguchi et al., 2015). Macrófagos pré-estimulados com VE's interferem na sinalização de insulina em adipócitos humanos e podem apresentar um fenótipo mais pró-inflamatório, sugerindo um possível papel para as vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo humano em um ciclo pró-inflamatório recíproco entre adipócitos e macrófagos, com potencial para agravar a resistência à insulina local e sistêmica (Mariette et al. 2014; Noren Hooten and Evans 2020).

Além disso, micro-RNAs exossômicos secretados por adipócitos inibem a polarização de macrófagos M2 para promover a inflamação adiposa induzida por obesidade. Os exossomos secretados por adipócitos maduros transportaram miR-34a para os macrófagos, suprimindo assim a polarização M2 ao reprimir a expressão do fator 4 semelhante a Krüppel (Klf4). Com isso, o miR-34a pode ser entendido como um mediador chave de ações parácrinas em macrófagos adiposo-residentes (Pan et al. 2019).

Os mecanismos pelos quais as microvesículas medeiam a sinalização intercelular pode envolver a ativação de receptores na membrana plasmática das células receptoras, sendo capazes de transportar membranas ligantes e até mesmo moléculas de RNA para as células alvo, onde esses RNA's funcionam de maneira semelhante ao RNA endógeno (Ogawa et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ismail et al., 2013, Yaqin et al. 2016;). O receptor CCR5, por exemplo, pode ser transferido de células mononucleares periféricas do sangue para células endoteliais via microvesículas (Mack, M. 2000; Ogawa, R. 2010), exercendo sinais direcionados entre células e transferindo diretamente moléculas bioativas dentro de seus compartimentos (Mack, M. 2000; Ogawa, R. 2010; Yaqin et al. 2016)

Um dos maiores desafios terapêuticos tem sido o desenvolvimento de estratégias que promovam a resolução da inflamação vascular. O estudo de exossomos produzidos por macrófagos derivados da medula óssea naive (BMDM-exo) contêm microRNA-99a/146b/378a antiinflamatórios que são ainda aumentados em exossomos produzidos por BMDM polarizado com IL-4 (BMDM-IL-4-exo). Esses microRNAs exossômicos suprimem a inflamação ao direcionar a sinalização de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  e promover a polarização M2 em macrófagos receptores (Bouchareychas et al. 2020). Outros estudos, no entanto, já apontam que macrófagos são capazes de internalizar vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (MSC's) de forma eficiente, provocando mudança de um fenótipo M1 para M2, com regulação positiva de marcadores da ativação alternativa como IL-10 e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e declínio de marcadores M1 como fator A de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , quimiocina com motivo C-C 24 e 17 (CCL-24 e CCL-17) (Sicco et al 2017; Willis et al. 2017; Bouchareychas et al. 2020). Os dados indicam que as MSC-VEs possuem propriedades anti-inflamatórias eficazes, tornando-os potenciais agentes terapêuticos (El Andaloussi et al. 2013; Monsel et al. 2016; Keshtkar, Azarpira, and Ghahremani 2018; Cao et al. 2019).

Em infecções, vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais de adipócitos e de células-tronco derivadas de adiposo tem sido propostas como o potencial terapêutico na moderação da morbidade e mortalidade de infecções, como na COVID-19 (Mazini, Rochette, and Malka 2021). Exossomos de ADSCs carregam diversas moléculas com propriedades imunomoduladoras que podem participar da imunomodulação na COVID-19, como TGF- $\beta$ , fator de crescimento e

desenvolvimento-11 (GDF-11), fatores de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento do nervo (NGF), fator de crescimento indutor de insulina (IGF), IL-1, IL-6, TLR-2, TLR-4, INF- $\gamma$  e um painel de miRNAs totalmente secretados dentro de seus exossomos (Mazini et al. 2019; 2020).

Além disso, um estudo com HIV também identificou perturbações metabólicas e inflamatórias associadas a um perfil de miRNA extraídos de pequenas vesículas extracelulares (sEVs) de indivíduos infectados pelo HIV com e sem alterações lipodistróficas (miR-20a-3p foi aumentado e miR-324-5p e miR-186 foram reduzidos em sEVs de indivíduos HIV lipodistróficos). Mudanças nesses miRNAs se correlacionaram com a expressão de Dicer adiposo e marcadores clínicos (Srinivasa et al. 2021).

Assim, sugerimos que microvesículas e exossomos derivadas de adipócitos podem interferir na polarização de macrófagos infectados, favorecendo a permanência de patógenos intracelulares *in vitro*, como micobactérias, através da regulação de vias de sinalização e formação de corpúsculos lipídicos. No entanto, muitos estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para encontrar um tratamento eficaz para os pacientes que sofrem de tais infecções. Esse trabalho, portanto, tem como objetivo elucidar tais mecanismos envolvidos, focando principalmente em fatores solúveis liberados por adipócitos, como principais contribuintes e intermediadores da comunicação celular e alterações funcionais de macrófagos infectados.

## 2 – JUSTIFICATIVA

Apesar de existirem diversos estudos sobre o papel/função das interações entre células adiposas e células do sistema imune durante a metainflamação, poucos trabalhos têm investigado a influência dos fatores produzidos por adipócitos na função de macrófagos infectados por patógenos intracelulares. Ao desvendar tais mecanismos, será possível a melhor compreensão de como infecções, como a micobacteriana, podem ser favorecidas e/ou evitadas por fatores metabólicos endógenos, como na obesidade, buscando, assim, terapias mais eficazes em seu controle.

### 3 – OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL:

Investigar a relação entre fatores secretados por adipócitos (FSA) como citocinas, adipocinas e vesículas extracelulares na ativação macrofágica durante a infecção pelo patógeno intracelular, *Mycobacterium bovis*, BCG *in vitro*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não com *M. bovis* BCG e estimulados com meio condicionado de adipócitos contendo os fatores solúveis secretados;
- 2) Avaliar o perfil de polarização de macrófagos através da análise da síntese de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório, adipocinas e NO, em macrófagos estimulados ou não com fatores solúveis secretados por adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG;
- 3) Avaliar o papel da expressão de PPAR $\gamma$ , através da sua supressão em macrófagos estimulados ou não com fatores secretados por adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG;
- 4) Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com microvesículas e exossomos derivados de adipócitos e infectados com *M. bovis* ou não;

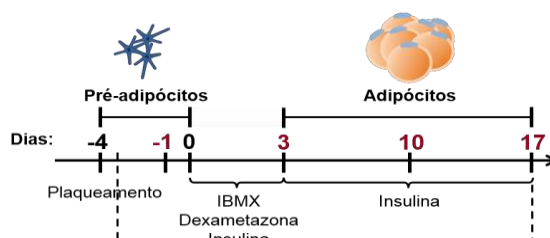
- 5) Avaliar o perfil de polarização de macrófagos através da análise da síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos estimulados ou não com microvesículas e exossomos derivados de adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1

A linhagem de pré-adipócitos murinos NIH3T3-L1 foram gentilmente cedidas pela Dra. Clarissa Maya Monteiro, do Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RJ. Para manter as células em seu estado não diferenciado (pré-adipócitos), utilizamos meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 4,5 g/L de glicose (*Invitrogen*) suplementado com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (*Gibco*) e 10% de soro bovino (*Invitrogen*). As células foram contadas e plaqueadas ( $20 \times 10^3$  células/ml) em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (*Invitrogen*), no qual foram mantidas por 4 dias. A diferenciação foi então induzida pela adição de meio DMEM 4,5 g/L de glicose suplementado com penicilina e estreptomicina, 10% soro fetal bovino, 1 µM de dexametazona (*Sigma Aldrich*), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) (*Sigma Aldrich*) e 0,3 unidades/ml de insulina (*Humulin Regular – Lily*) por 3 dias. Introduzimos então meio DMEM, 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina, 10% de soro fetal bovino e 0,3 unidades de insulina/mL, substituindo 75% de seu volume total de 2 em 2 dias até o final da diferenciação. Desta forma, o dia -1 corresponde aos pré-adipócitos e o dia 17, aos adipócitos maduros. A coleta do sobrenadante foi feita em seguida, sendo usado a fresco ou congelado de acordo com o experimento (Palhinha et al. 2019) (Figura 12).

**Figura 12**

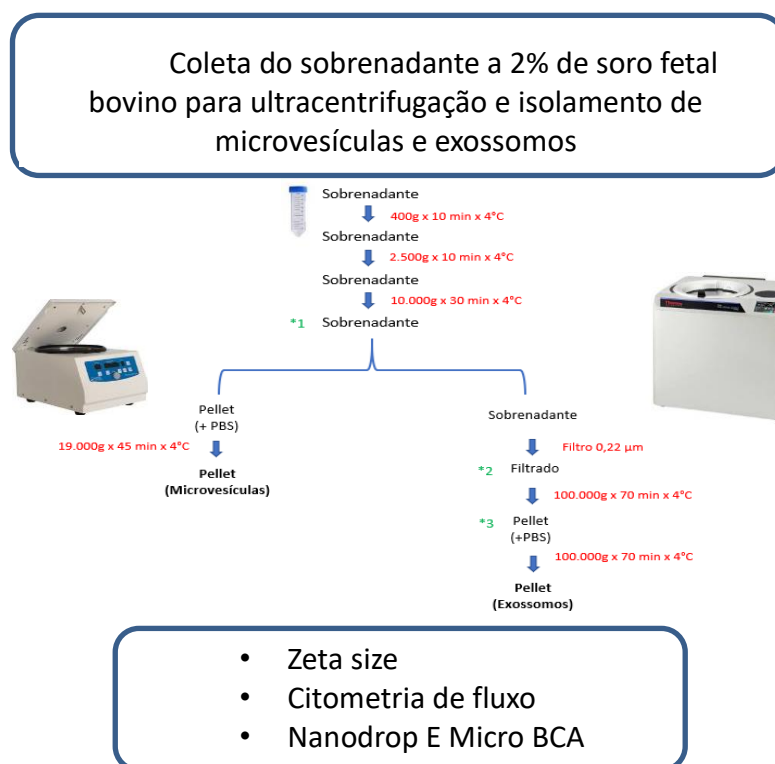


**Figura 12. Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1.** As células são submetidas ao meio de indução da diferenciação (IBMX, dexametazona, insulina) no dia 0. Após 3 dias são mantidas no meio de maturação (insulina) até o final da diferenciação (Palhinha et al. 2019).

## 4.2– ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS

O isolamento das microvesículas e exossomos foi realizado por centrifugação diferencial do sobrenadante de adipócitos, congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento foi feito no gelo e a centrifugação estabelecida conforme os parâmetros (Momen-heravi 2017; Pospichalova et al. 2015) (Figura 13). Todas as centrifugações e procedimentos foram realizados em  $4^{\circ}\text{C}$  para minimizar a degradação de proteínas. Células presentes no sobrenadante foram removidas por centrifugação de baixa velocidade a  $400 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi então centrifugado sequencialmente a  $2500 \times g$  por 10 min (centrífuga multispeed ThermoScientific IEC CL31R, rotor T41 \* 11210435) e  $10.000 \times g$  por 30 min para remover quaisquer detritos celulares / corpos apoptóticos restantes (Ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100XP). O pelet obtido foi ressuspensionado em tampão fosfato salino (phosphate buffered saline – PBS) e novamente centrifugado a  $19.000 \times g$  por 45 min. O sobrenadante foi centrifugado a  $19.000 \times g$  e o pelet obtido contendo microvesículas foi ressuspensionado novamente em PBS e aliquoteado a cada  $50 \mu\text{l}$ . Já o sobrenadante depletado de microvesículas (última centrifugação à  $19000 \times g$ ) foi filtrado em filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  e submetido a ultracentrifugação para obtenção de exossomos. A ultracentrifugação foi feita a  $100.000 \times g$  por 70 min, o sobrenadante lavado em PBS e novamente ultracentrifugado a  $100.000 \times g$  por 70 min. Após a lavagem, o sedimento exossômico foi cuidadosamente ressuspensionado. O pellet foi então aliquoteado a cada  $50 \mu\text{l}$  e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou  $4^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 13****Figura 13:** Protocolo de isolamento de microvesículas e exossomos.

### 4.3– DEPLEÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

VE's são idealmente obtidas da cultura de células com meio condicionado por soro fetal bovino (FBS), soro de outras espécies ou outros produtos complexos, como lisado de plaquetas, extratos hipofisários, sais biliares e muito mais (Li et al. 2015; Beninson et al. 2015). Quando o uso desses suplementos é inevitável, os experimentos devem incluir um controle médio para avaliar a contribuição do próprio meio, evitando o co-isolamento de EVs exógenas. No caso de adipócitos, a privação de nutrientes, e, em outras células, até mesmo a privação de VE's, podem alterar o comportamento celular, a liberação, natureza e composição das VEs liberadas (Li et al. 2015; Beninson et al. 2015).

A quantidade de VE's identificadas no meio RPMI com baixa concentração de SFB (2% SFB), usado no momento dos experimentos, foi comparada com a quantidade de VE's identificadas no sobrenadante de adipócitos em 24 horas, também contendo RPMI 2% SFB. Essa análise foi feita para se pesquisar a presença de

vesículas extracelulares no meio utilizado em todo experimento, já que por questões técnicas, não foi possível a depletação de VE's do soro fetal bovino. Dessa forma, o meio RPMI 2% SFB e o sobrenadante de adipócitos foram submetido aos mesmos procedimentos de centrifugação e ultracentrifugação para isolamento das microvesículas e exossomos. O pellet final foi então ressuspenso em PBS e submetido ao Zeta Sizer.

#### **4.4 – CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) destacou a necessidade de considerar questões ao fazer conclusões fortes sobre o envolvimento de VE's, populações específicas (exossomos em particular), situações fisiológicas ou patológicas, ou ao propor sua carga molecular como marcadores biológicos (MISEV2014; Lotvall et al. 2014). Dessa forma, foi estabelecido um protocolo de isolamento, identificação e caracterização de subpopulações de VE's, microvesículas e exossomos, submetendo-as à análise por citometria de fluxo e ao Zeta Sizer, como ponto de partida para comprovação das populações envolvidas.

##### **4.4.1 – CITOMETRIA DE FLUXO**

Para identificação e quantificação de microvesículas, as amostras foram submetidas à citometria de fluxo (Citômetro de Fluxo BD FACSCanto II Flow Cytometer). Alíquotas contendo microvesículas após isolamento por centrifugação foram marcadas com Anexina V (10X Annexin V Binding Buffer, BD Pharmingen™, cat. 556547) usando-se o fluorocromo PE-H. Um conjunto de suspensões de microesferas de 1 µm (Fluoresbrite PolyFluor 570 Microspheres) foi usado como referência de tamanho. Uma amostra não corada foi adquirida para detectar a autofluorescência da amostra e definição do fotomultiplicador para os canais usados. A fluorescência foi controlada por ajuste na sobreposição espectral, adquirindo tubos de cor única. Frente e lateral canais de dispersão (FSC e SSC) foram utilizados em escala logarítmica visualizado no modo bi-exponencial. Os fotomultiplicadores FSC e SSC foram definidos usando o ruído de fundo como o limite óptico mais baixo a partir de uma amostra de PBS estéril. O limite, definido no Canal FSC, foi regulado para reduzir progressivamente o ruído, alocando pontos no canto inferior esquerdo da

plotagem, para detectar claramente as MVs. Os gráficos foram construídos usando o programa Flow Jo 10.6.1.

O “sobrenadante completo” corresponde ao sobrenadante antes do processo centrifugação, recolhido diretamente da placa com adipócitos diferenciados. O “sobrenadante concentrado” corresponde ao pellet de microvesículas formado após a centrifugação (concentrado). O “sobrenadante depletado” corresponde ao sobrenadante coletado acima do pellet após as centrifugações.

#### **4.4.2 – ZETA SIZER**

A análise por ZETA SIZER é um dos sistemas mais utilizados no mundo para a medição do tamanho, da mobilidade eletroforética de proteínas, do potencial zeta de soluções coloidais e nanopartículas, com a opção de medição da mobilidade de proteínas e microrreologia de soluções de proteínas e polímeros.

O Zetasizer Software (ZetaSizer Nano SZ – Malvern Instrumentos da Central Bio/FF/UFJF e Embrapa – Gado de Leite) foi usado para medição do tamanho de microvesículas e exossomos por número e intensidade da dispersão luminosa. Foram realizadas comparações a partir de amostras armazenadas sob diferentes temperaturas – armazenadas a 4°C e -80°C. Não era necessário ajustar o pH da solução. As amostras utilizadas foram as alíquotas obtidas da centrifugação e ultracentrifugação de acordo com o item 4.2, descongeladas em gelo após 7 dias, vortexadas por 1 minuto momentos antes da análise, diluídas 1:9 em PBS e colocados em tubos de leitura.

#### **4.4.3 - NANODROP**

As alíquotas da centrifugação e ultracentrifugação de acordo com o item 4.2, foram descongeladas (-80°C) em gelo, vortexadas 1 min antes da análise e uma gota contendo 1µl foi lida em espectrofotômetro NanoDrop Lite da Thermo Scientific™ em UV-Vis, compacto.

#### **4.4.4 – MICRO BCA**

Para confirmar a quantificação total do conteúdo protéico de microvesículas e

exossomos foi utilizado kit de dosagem de proteínas Micro BCA™ ProteinAssay (ThermoScientific™ Pierce™), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

#### **4.5 – OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos, com idade entre 6 a 8 semanas pesando aproximadamente 30 g, para obtenção dos macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF (protocolo 016/2016 CEUA/UFJF). Os animais foram eutanasiados em uma câmara de CO<sub>2</sub> e o lavado peritoneal foi feito injetando-se 4 mL de meio RPMI no peritônio, recolhendo todo o conteúdo em tubos falcons para posterior centrifugação (1500 rpm / 25°C / 5 min.). O *pellet* foi ressuspendido e o conteúdo celular foi contado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 1 x 10<sup>6</sup> células / mL. Em seguida, foram plaqueadas 1 x 10<sup>6</sup> células / mL / poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares em cada poço as quais seriam usadas para contagem de corpúsculos lipídicos e sobrenadante usado para dosagem de citocinas (ELISA). Para análise de Western Blot, foram plaqueadas 2x10<sup>6</sup> células por poço em placa de 6 poços. As células foram plaqueadas com meio RPMI, 1% de antibiótico penicilina / estreptomicina e 2% FBS. Após 2 h os poços foram lavados 3 x com 250 µl de meio RPMI, 1% penicilina/estreptomicina e incubados por 16 horas, com RPMI, 2% FBS e 1% antibiótico, até o estímulo dos macrófagos com meio condicionado de adipócitos (sobrenadante total contendo fatores secretados por adipócitos) e a infecção micobacteriana.

#### **4.6 – CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER**

A suspensão celular contendo o lavado peritoneal foi submetida a contagem em câmara de Neubauer para posterior plaqueamento. A amostra foi diluída 40X em corante Turk (Violeta de Genciana e ácido acético em proporção 1:100) e submetida à contagem, através dos 4 quadrantes.

#### **4.7 – ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS (CONTENDO FATORES SECRETADOS POR ADIPÓCITOS – FSA) DIFERENCIADOS**

No 17º dia de diferenciação adipogênica, os adipócitos foram mantidos por 24 h em placas de cultura de 24 poços contendo RPMI 4,5 g/L de glicose 1% penicilina/estreptomicina, 2% de SFB. Após as 24 h, o sobrenadante (meio condicionado) dos adipócitos foi então coletado em tubos falcons e centrifugado em 1500 x g por 10 min, a 4°C. O estímulo foi feito adicionando-se 1 mL de meio condicionado de adipócitos nos poços contendo  $1 \times 10^6$  de macrófagos plaqueados e 2 mL de meio condicionado de adipócitos nos poços contendo  $2 \times 10^6$  de macrófagos. Após 1 h, realizamos a infecção com *Mycobacterium bovis* BCG. Os poços contendo os macrófagos que não receberam estímulo com meio condicionado de adipócitos foram mantidos em RPMI 4,5 g/L de glicose contendo 1% penicilina/estreptomicina e 2% de SFB. Após 1 h 30 m os poços foram novamente lavados e os meios reestabelecido conforme antes da infecção.

#### **4.8 – ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ADIPÓCITOS**

Alíquotas contendo microvesículas e exossomos após a série de centrifugações foram descongeladas e submetidas à dosagem protéica total em Nanodrop e pelo kit Micro BCA de acordo com instruções do fabricante. A concentração estabelecida conforme a literatura para estímulo dos macrófagos foi de 25 µM, 50 µM ou 100 µM de VEs, correspondente a cada poço em placas de 24 poços. Os macrófagos peritoneais foram plaqueados 24 h antes do estímulo, na concentração de  $1 \times 10^6$ /poço/mL.

#### **4.9 – INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG**

Após 1 h de estímulo dos macrófagos peritoneais com meio condicionado de adipócitos contendo os fatores solúveis secretados (FSA), ou com microvesículas ou exossomos, foi feita a infecção das células com *Mycobacterium bovis*, BCG. As células foram infectadas em uma multiplicidade de infecções (MOI 5:1) com *Mycobacterium bovis*, BCG da cepa Moreau, obtidas na forma de vacina liofilizada em ampolas de 40 mg contendo aproximadamente  $80 \times 10^6$  bacilos. Os bacilos foram diluídos em RPMI estéril e ajustados na concentração de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia

(UFC)/mL. Na hora do uso os bacilos foram vortexados, sonicados por 5 min e homogeneizados 10 vezes por passagem em seringa 32 G. Após 1 h, os poços foram lavados com RPMI 1% penicilina/estreptomicina e o meio inicial foi restabelecido (FSA de adipócitos, ou RPMI 1% penicilina/estreptomicina 2% SFB, ou VE's) incubando-se os macrófagos durante 6, 24 e 48 h, para coleta do sobrenadante para dosagem de citocinas, adipocinas e NO. Foi realizada a fixação das células nas lamínulas para posterior coloração com Bodipy, Oil Red O e DAPI para contagem de corpúsculos lipídicos. As células cultivadas em placas de 6 poços, foram lisadas para obtenção de proteínas totais para realização do Western Blot.

#### **4.10 – COLORAÇÃO COM OIL RED O E BODIPY – ANÁLISE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS**

As lamínulas obtidas após o plaqueamento de macrófagos (item 4.5) foram fixadas em formalina 3,7% por 24 h e logo depois, seguiu-se a coloração com Oil-Red-O ou Bodipy para a contagem de corpúsculos lipídicos.

A solução estoque de Oil Red O (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de Oil Red O/100 mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma Aldrich), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente. No dia da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos, na própria placa de cultura ou a partir da confecção de lâminas permanentes.

A solução de formalina 3,7% foi retirada e os poços foram lavados com água destilada. Em seguida, foram adicionados 300 µL da concentração de Oil red O, e incubando por 5 min no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequência: 2 x com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. As lâminulas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células.

A biogênese de corpúsculos lipídicos foi avaliada quanto à infecção com BCG, estímulo com sobrenadante e VE's, e tratamento com GW. Os CLs foram contados em 50 células consecutivas, após análise em microscópio de fluorescência Olympus DP73 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100 ou 40x (Olympus,

Tokyo, Japan) ou a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100. A morfologia celular dos macrófagos, pré-adipócitos e adipócitos também foi avaliada. As imagens foram analisadas por meio do programa CellSens Dimension.

#### **4.11 – ESTÍMULO COM GW9662 – ANTAGONISTA DE PPAR $\gamma$**

Foi utilizado 1  $\mu$ M/mL de GW9662 (Cayman Chemical, no. 70785), antagonista de PPAR $\gamma$ , para avaliar o efeito deste receptor nos macrófagos estimulados com FSA ou VE's e infectados por BCG. Foram plaqueadas 1 x 10<sup>6</sup> células/ml/poço (placa de 24 poços). O estímulo foi feito administrando-se a dosagem em meio RPMI ou sobrenadante contendo FSA, 1 h antes da infecção. Após a lavagem dos poços, o tratamento foi restabelecido juntamente ao meio RPMI ou sobrenadante.

#### **4.12 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) segundo ANOVA seguido pelo teste *t* de Student, com significância de  $p < 0.05$ . Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS NIH3T3-L1

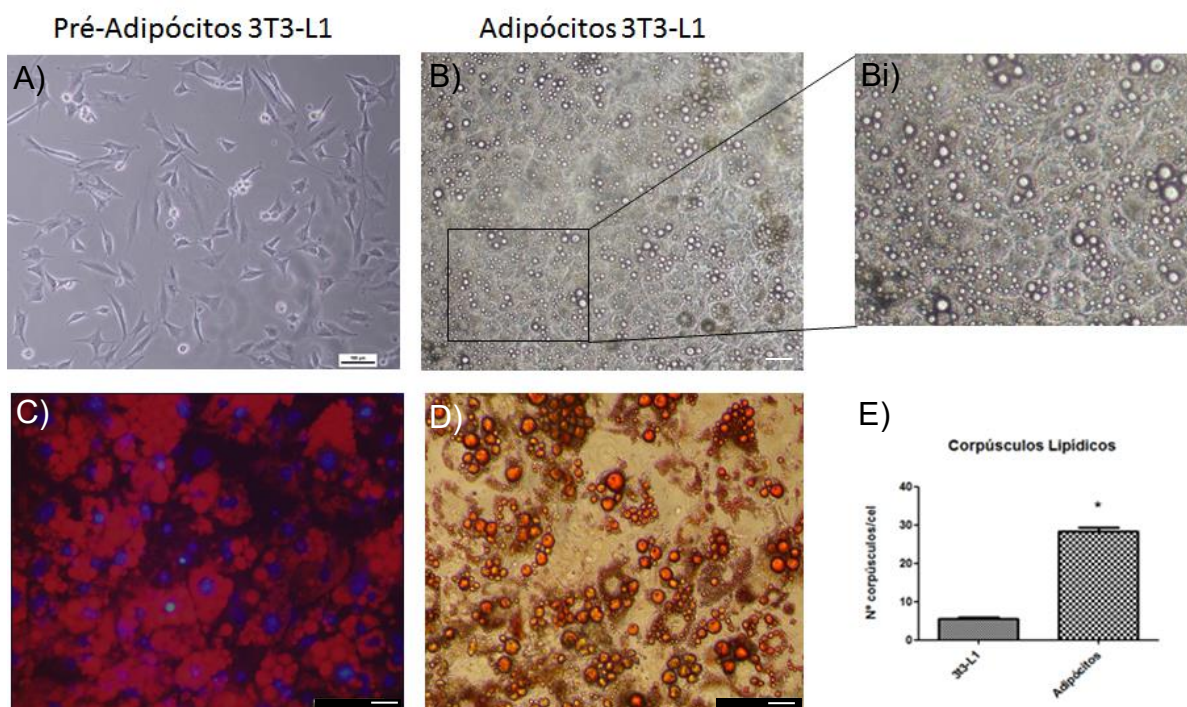
Para, confirmarmos a diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3- L1, foram avaliadas as diferenças na morfologia celular, no acúmulo e na hipertrofia de corpúsculos lipídicos, no dia 0 e no dia 17 de diferenciação adipogênica. Durante o período que antecede os estágios de diferenciação celular, as células encontravam-se com características morfológicas típicas de fibroblastos, apresentando-se alongadas, com citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme além de longos prolongamentos (Figura 14 A). A partir do 4º dia em que as células NIH3T3-L1 foram submetidas ao processo de diferenciação, mudanças na morfologia celular começaram a ocorrer, e no 17º dia de diferenciação, as células apresentaram características típicas de adipócitos, como forma arredondada, núcleo deslocado para a periferia e intenso acúmulo de CLs por todo citoplasma (Figura 14 B e 14 Bi).

A biogênese de CLs foi utilizada como indicativo de diferenciação adipogênica das células NIH3T3-L1. A partir do 4º dia em que as células foram submetidas ao processo de indução de diferenciação, foi verificado um aumento em número e tamanho de CLs (Figura 14 C e D). No 17º dia, quando observamos a morfologia de adipócitos completamente diferenciados, esse aumento foi considerável ao se comparar com os pré-adipócitos NIH3T3-L1 (Figura 14 E). As análises foram feitas com a coloração de *Oil Red O* (ORO), corante específico para lipídios neutros, e DAPI para o núcleo, analisadas em microscopia de fluorescência. Observou-se que quanto maior o tempo de diferenciação das células e mais precisamente no 17º dia, maior o acúmulo de CLs, indicando que as células estavam em estágio completo de diferenciação. Aumento este que se mostrou significativo.

Celulas pré-adipogênicas em seu estado indiferenciado, possuem baixa quantidade de CLs quando comparadas aos adipócitos diferenciados, o que foi evidenciado pela marcação com Oro Red O (Figura 14 C e D).



Figura 14



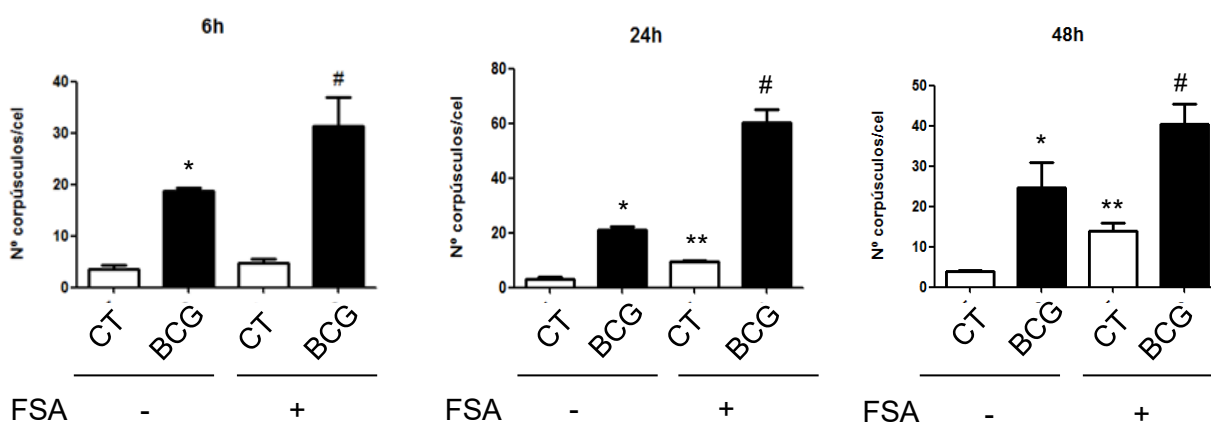
**Figura 14: Análise do processo de diferenciação celular.** (A) Morfologia de NIH3T3-L1 indiferenciadas, e (B) Morfologia de adipócitos diferenciados, no 17º dia de diferenciação adipogênica, e (Bi) ampliação do campo. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100. (C) Análise por microscopia de fluorescência de adipócitos diferenciados (17 dia); (D) Análise por microscopia de luz de adipócitos diferenciados; (E) Quantificação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3-L1 e adipócitos. As células foram coradas com ORO e em seguida marcadas com corante DAPI para observação dos núcleos. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, escala correspondente a 20  $\mu$ m, aumento de 20x. (\*) Indica diferença significativa entre os grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

## 5.2 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS (CL) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA)

Foi avaliada a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais infectados ou não com *Mycobacterium bovis* BCG em uma multiplicidade de infecções de cinco bactérias a cada uma célula (MOI 5:1). O sinal (+) ou (-) indica, respectivamente, presença ou ausência de estímulo com FSA.

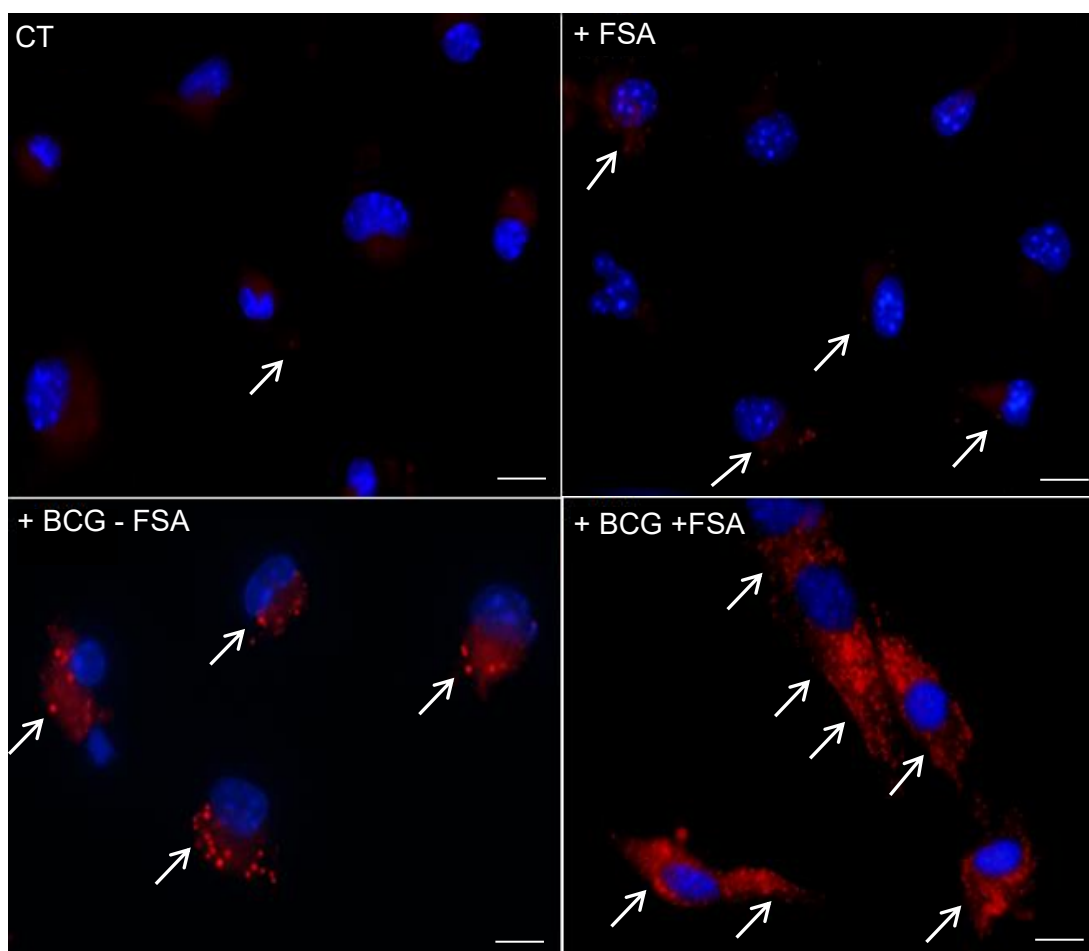
Nos 3 tempos analisados, 6, 24 e 48 h, a infecção micobacteriana foi capaz de induzir a formação de CLs de modo significativo quando comparado ao grupo controle. De modo interessante, podemos observar que FSA por si só, também já foi capaz de induzir a formação de CLs em macrófagos não infectados. No entanto, no grupo BCG na presença de FSA, teve a biogênese de CLs potencializada quando comparado ao grupo BCG não estimulado, nos 3 tempos analisados (Figura 15 e 16).

**Figura 15**



**Figura 15: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com FSA e infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1.** O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. Foram contados 50 núcleos por n. (\*) indica diferença significativa do grupo BCG em relação ao grupo controle, ambos sem estímulo com FSA; (\*\*) indica diferença significativa do grupo controle estimulado com FSA e controle não estimulado. (#) indica diferença significativa do BCG estimulado com sobrenadante, em relação a ambos os grupos controle estimulados com FSA e BCG não estimulado com FSA. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

Figura 16



**Figura 16: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados ou não com FSA (24 h). O estímulo com FSA é indicado com sinal +. Os CLs são indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI. Escala correspondente a 10  $\mu$ m, aumento de 100x.**

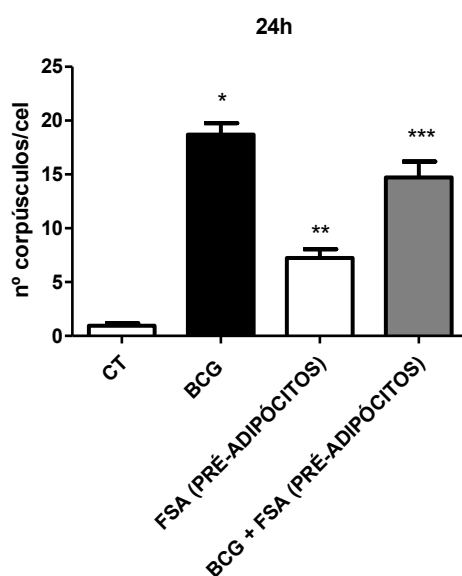
### **5.3 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE PRÉ-ADIPÓCITOS**

Também foi avaliada a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais infectados ou não com *Mycobacterium bovis* BCG e estimulados ou não com meio condicionado de pré-adipócitos, antes da diferenciação. Isso foi feito para saber se somente adipócitos completamente diferenciados seriam capazes de induzir

modificações no metabolismo lipídico de macrófagos. O tempo de 24 h foi escolhido para análise, pois neste tempo foi observada a maior taxa de formação de corpúsculos lipídicos na presença do estímulo com FSA de adipócitos diferenciados .

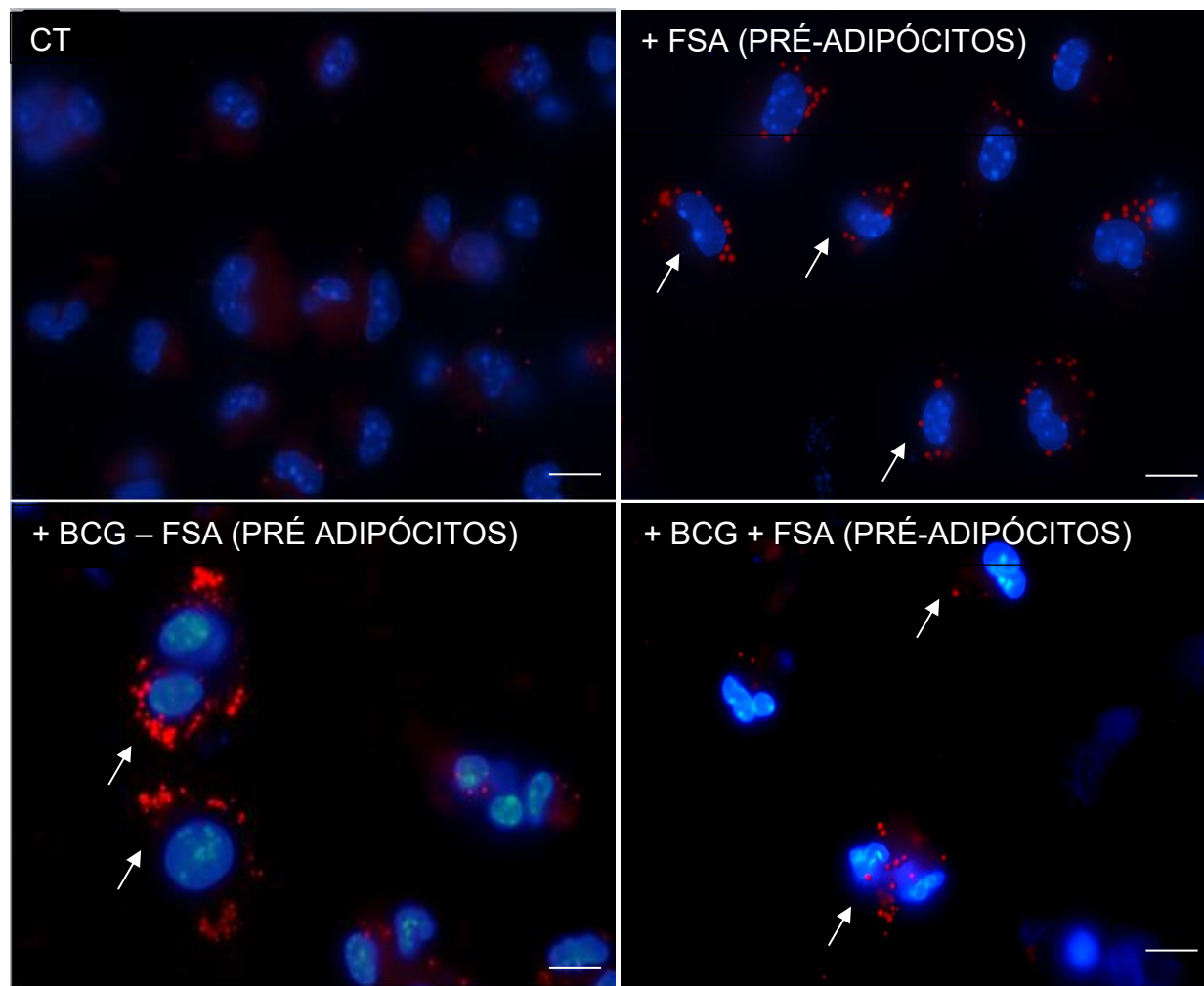
A infecção micobacteriana na presença de meio condicionado de pré-adipócitos não teve o mesmo efeito na formação de CLs, quando comparado ao meio condicionado de adipócitos diferenciados, ou seja, a formação de CLs não foi potencializada no grupo infectado na presença de sobrenadante de pré-adipócitos (Figura 17 e 18).

**Figura 17**



**Figura 17: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com meio condicionado de pré-adipócitos NIH3T3-L1 e infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1.** Foram contados 50 núcleos por n. (\*) Indica diferença significativa do grupo BCG em relação ao grupo controle. (\*\*) Indica diferença significativa do grupo estimulado com FSA de pré-adipócitos NIH3T3-L1 em relação ao controle. (\*\*\*) indica diferença significativa apenas entre grupo BCG estimulado ao grupo controle estimulado. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

Figura 18



**Figura 18: Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados ou não com meio condicionado de pré-adipócitos NIH3T3-L1 (24 horas). O estímulo com FSA de pré-adipócitos é indicado com sinal +. Os corpúsculos lipídicos são indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI. Escala correspondente a 10  $\mu$ m, aumento de 100x.**

#### **5.4 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA)**

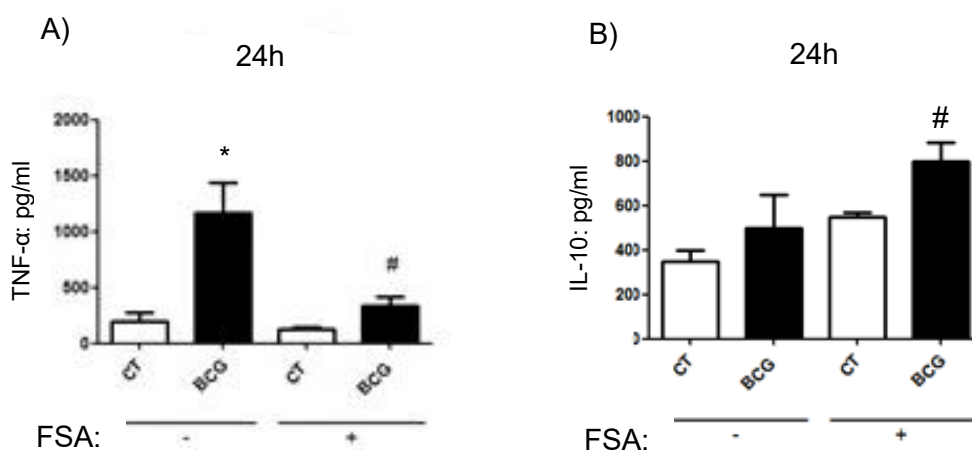
O TNF- $\alpha$ , é secretado principalmente por macrófagos e, além de causar a morte

de células tumorais, promove a resposta imune e pró-inflamatória estimulando a síntese de outras citocinas e recrutando neutrófilos e monócitos para o local da infecção (Shen et al. 2017; Xu et al. 2017; Nourian et al. 2017). Já a IL-10, é uma citocina de resposta anti-inflamatória característica, que possui efeitos imunoregulatórios sobre macrófagos e sobre a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (Xue et al. 2017; Kubota et al. 2017; Alvarado et al. 2017). A produção das citocinas TNF- $\alpha$ , de perfil pró-inflamatório e IL-10, de perfil anti-inflamatório, pelos macrófagos foi avaliada através de ensaio de ELISA, no tempo de 24 horas de infecção por *M. bovis* BCG, com MOI 5:1 e/ou estímulo com FSA.

A presença de infecção por BCG, aumentou a produção de TNF- $\alpha$ , quando comparado ao grupo controle. No entanto, este efeito pareceu ser menor na presença de FSA (Figura 19 A).

Quanto aos níveis de IL-10 para MOI 5:1, não encontramos diferenças significativas entre o grupo BCG e controle ambos não estimulados. Porém, a infecção na presença de estímulo com FSA induziu uma maior produção dessa citocina de perfil anti-inflamatório (Figura 19 B).

**Figura 19**

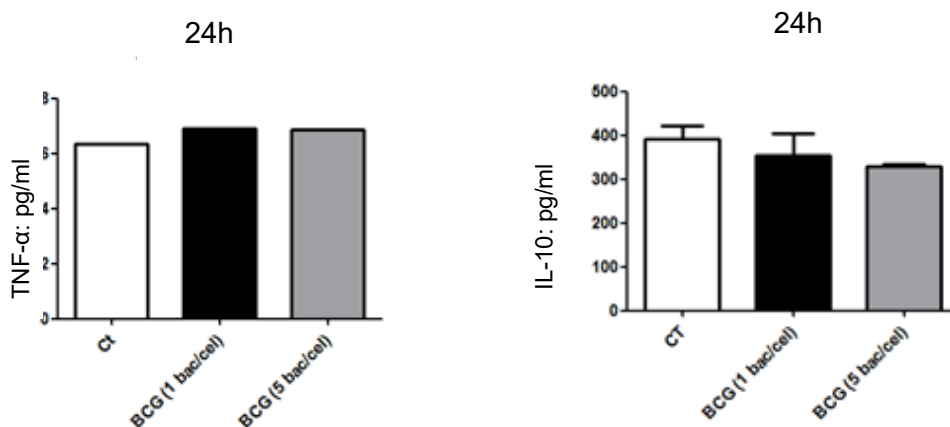


**Figura 19: Síntese de TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com FSA. (\*) Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. (#) indica diferença significativa entre o grupo BCG estimulado e ambos os grupos controle estimulado e BCG na ausência de estímulo. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,5$**

## 5.5 – PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ E IL-10 EM ADIPÓCITOS INFECTADOS

Os adipócitos foram propostos como nichos para *M. tb* no estado latente, e por isso, entender a interação de patógenos virulentos com adipócitos é importante (Kim et al. 2011). Nós infectamos adipócitos diferenciados da linhagem NIH3T3-L1 com 1 bacilo/célula ou 5 bacilos/célula e avaliamos os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 produzidos. Nossos resultados indicaram baixa produção de TNF- $\alpha$  pelos adipócitos, não sendo encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 20 A). Quanto à produção de IL-10, verificou-se que adipócitos produzem essa citocina, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo controle e os grupos infectados com MOI 1:1 ou 5:1 (Figura 20 B). As células foram mantidas em meio RPMI 2% de soro por mais 24 horas após o 17<sup>o</sup> dia de diferenciação.

**Figura 20**



**Figura 20: Produção de citocinas por adipócitos infectados.** A) Produção de TNF- $\alpha$ . B) Produção de IL-10. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão.

## 5.6 – PRODUÇÃO DE ADIPOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA)

Nós avaliamos os níveis de leptina e adiponectina em cultura de macrófagos

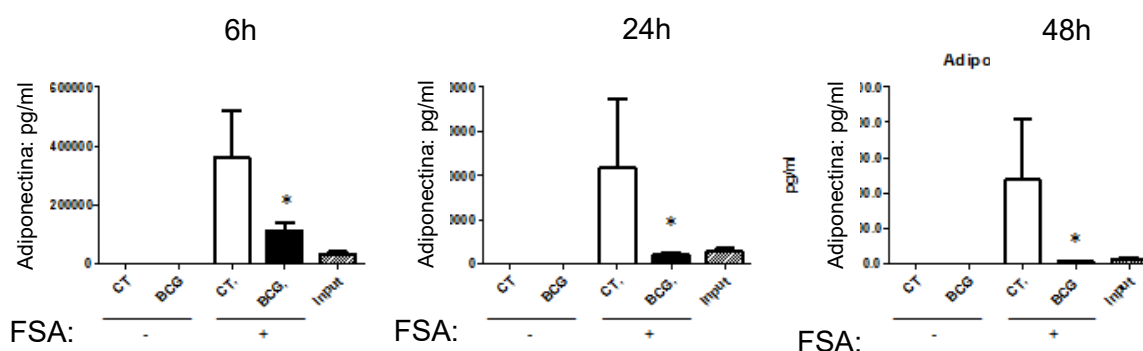


estimulados com FSA, ou não, e infectados com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), ou não, através de ensaio de ELISA, nos tempos de 6, 24 e 48 horas. A captação de leptina através de seu receptor, induz várias alterações metabólicas intracelulares via JAK2-STAT3 e PI3K-AKT-mTOR, como aumento da captação de glicose, aumento da regulação das enzimas glicolíticas e interrupção da função mitocondrial, além de alterações imunológicas, como aumento da atividade fagocítica e secreção de citocinas pró-inflamatórias em diferentes tipos de células, incluindo adipócitos e macrófagos (Jéquier et al. 2002; Monteiro et al. 2019). A adiponectina é o peptídeo mais abundante secretado pelos adipócitos, cuja redução desempenha um papel central nas doenças relacionadas à obesidade, incluindo resistência à insulina/diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Achari and Jain 2017).

Não foram encontrados níveis significativos da produção de leptina pelos macrófagos, nem com relação aos grupos estimulados com sobrenadante, nem nos grupos não estimulados (dados não mostrados). Além disso, foram encontrados níveis basais de leptina no sobrenadante de adipócitos diferenciados, sendo este coletado no 17º dia de diferenciação (dados não mostrados).

Quanto aos níveis de adiponectina, os grupos não estimulados produziram níveis não detectados quando comparados aos grupos estimulados com FSA, onde a produção desta adipocina foi elevada no grupo controle nos 3 tempos analisados (Figura 21). Podemos observar ainda, que a presença de *M. bovis* BCG na presença de estímulo com FSA regulou negativamente a produção de adiponectina em ambos os tempos analisados.

**Figura 21**



**Figura 21: Síntese de Adiponectina em 6, 24 e 48 h de estímulo e infecção.** Síntese de Adiponectina



em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com FSA. O "input" indica estímulo com sobrenadante de pré-adipócitos. (\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

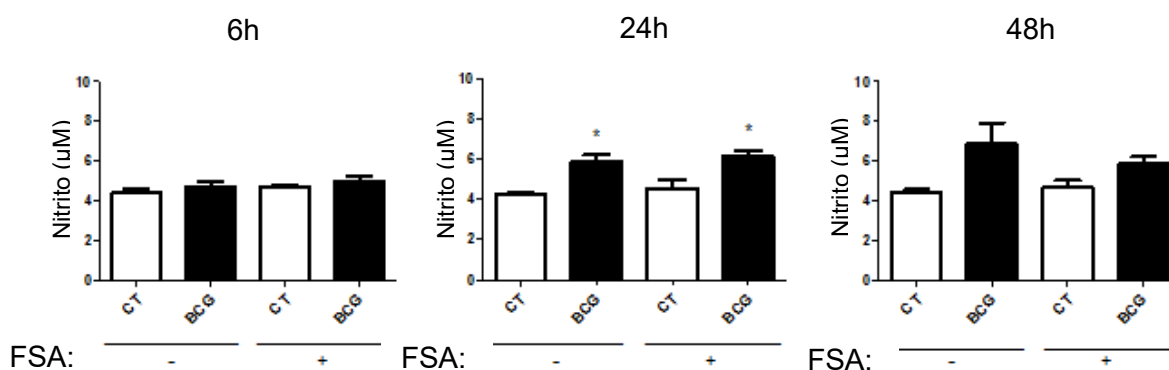
### 5.7 – PRODUÇÃO DE NITRITO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium Bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA)

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) com propriedades microbicidas produzido por macrófagos perante ativação e estímulo de infecções, e também um marcador de polarização macrofágica (Caruso et al. 2017; Tsikas et al. 2017; Mantzaris et al. 2017). As ROS geradas pela célula são importantes para a defesa do hospedeiro (Gal et al. 2002). A expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) é aumentada pelo tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) e ativação do fator nuclear kB (NF-kB) e, conseqüentemente, a concentração de NO produzida é aumentada (Brown et al. 2001; Caruso et al. 2017; Tsikas et al. 2017).

A produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais foi avaliada por detecção indireta de nitrito nos grupos estimulados com FSA, ou não, e infectados com *M. bovis* BCG, ou não (Figura 22).

Após 24 horas de infecção micobacteriana verificamos uma elevação na produção de nitrito que não foi alterada pelo estímulo com FSA. Nos demais tempos de infecção e estímulo, nenhuma diferença significativa foi encontrada.

**Figura 22**

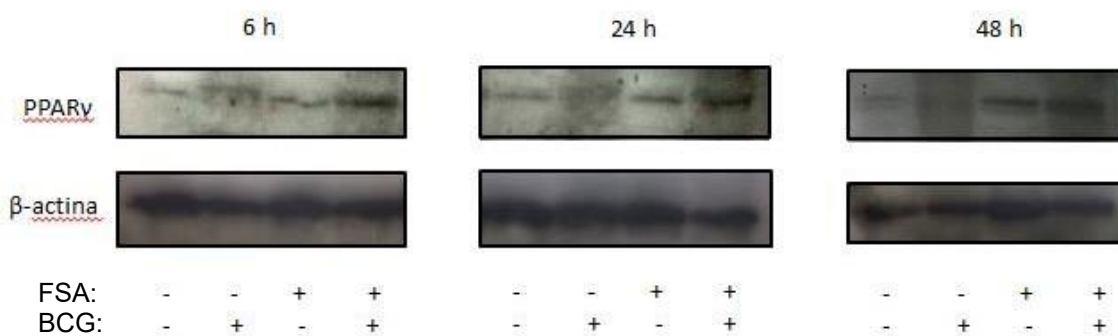


**Figura 22: Produção de Nitrito em 6, 24 e 48 h de estímulo e infecção:** Produção de NO em macrófagos peritoneais estimulados (+) ou não (-) com FSA e infectados ou não, com *M. bovis* BCG, MOI 5:1. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

### 5.8 – EXPRESSÃO DE PPAR $\gamma$ EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium Bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA)

A expressão do receptor nuclear PPAR $\gamma$  foi analisada a partir da técnica de Western Blot, durante os tempos de 6, 24 e 48 hs de infecção micobacteriana, ou não, e estímulo com FSA, ou não (Figura 23). O resultado indica que a expressão gênica de PPAR $\gamma$  é aumentada na presença de infecção nos três tempos analisados e o estímulo com FSA potencializou essa expressão em todos os tempos. De modo interessante o estímulo com sobrenadante nos macrófagos controles também mostrou um perfil aumentado de indução da expressão quando comparados aos macrófagos controles que não foram estimulados com sobrenadante.

**Figura 23**



**Figura 23: Expressão de PPAR $\gamma$ .** Macrófagos foram estimulados com FSA (FSA +) ou não (FSA -) e infectados com *M. bovis* BCG MOI 5:1 (BCG +) ou não (BCG -), durante 6, 24 e 48 horas.

### 5.9 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS FRENTE À INIBIÇÃO DE PPAR $\gamma$ POR GW9662 EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium Bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS

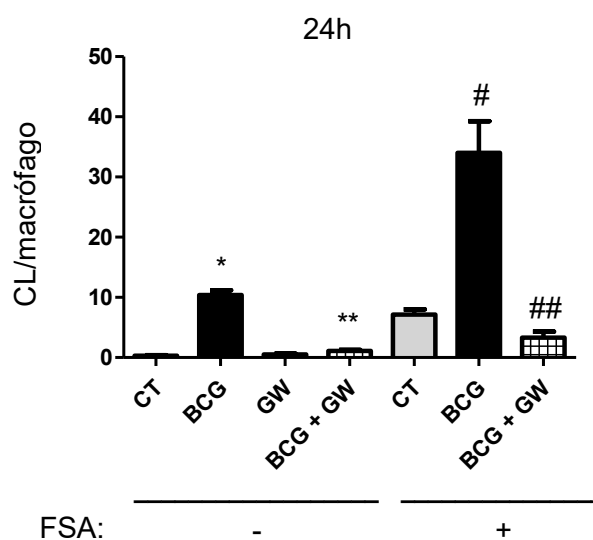
## SECRETADOS (FSA)

A formação de corpúsculos lipídicos foi avaliada após a inibição da via do receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Estudos anteriores demonstram que patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG podem induzir um mecanismo de escape regulando uma das diferentes vias de sinalização celular na formação do CL dentro dos leucócitos – a via do receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Almeida et al. 2009, Almeida et al. 2014). Porém, os mecanismos referentes à ativação de PPAR $\gamma$  e metabolismo lipídico perante a ativação de macrófagos por fatores secretados por adipócitos, não estão esclarecidos.

O grupo BCG induziu a formação de corpúsculos lipídicos, evento este que foi potencializado pelo FSA (Figura 24 e 25) quando comparado ao grupo controle.

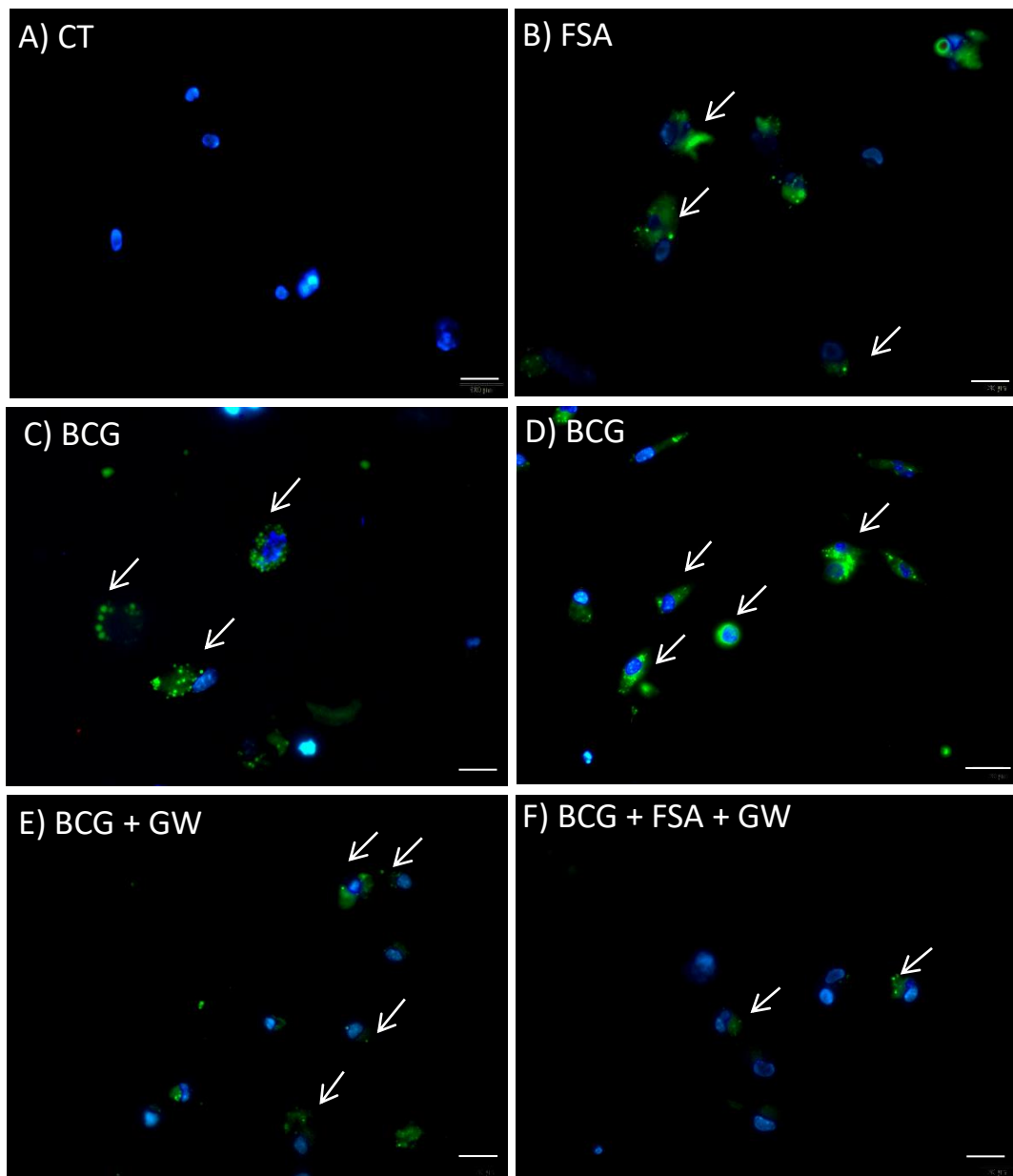
O tratamento com o antagonista de PPAR $\gamma$ , no entanto, foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos em ambos os grupos estimulados com FSA e infectados.

**Figura 24**



**Figura 24: Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com FSA, tratados ou não com GW9662 e infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1.** O estímulo com FSA e com GW é indicado com sinal +. Foram contados 50 núcleos por n. (\*) Indica diferença significativa do grupo BCG em relação ao grupo controle, ambos sem estímulo com FSA; (\*\*) Indica diferença significativa entre o grupo BCG tratado com GW e BCG não tratado com GW. (#) indica diferença significativa do BCG estimulado com FSA, em relação a ambos os grupos: controle estimulado e BCG não estimulado; (##) Indica diferença significativa em relação ao grupo BCG estimulado não tratado com GW e em relação ao grupo BCG tratado com GW não estimulado com FSA. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

Figura 25



**Figura 25: Inibição da biogênese de CL's por GW 9662 em macrófagos estimulados ou não com FSA e infectados com BCG ou não.** Os macrófagos foram infectados por *M. bovis* BCG, MOI 5:1 (BCG), estimulados ou não FSA, e tratados ou não com GW 9662. O estímulo com FSA e com GW 9662 é indicado com sinal +. (A) Grupo BCG; (B) Grupo estimulado com FSA e infectado; (C) Grupo infectado e tratado com GW; (D) Grupo estimulado com FSA, infectado com BCG e tratado com GW 9662. Os corpúsculos lipídicos são indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100 no aumento de 40x e a análise da

formação de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Bodipy, contra-coloração do núcleo com DAPI. Escala correspondente a 20  $\mu\text{m}$ , aumento de 40x.

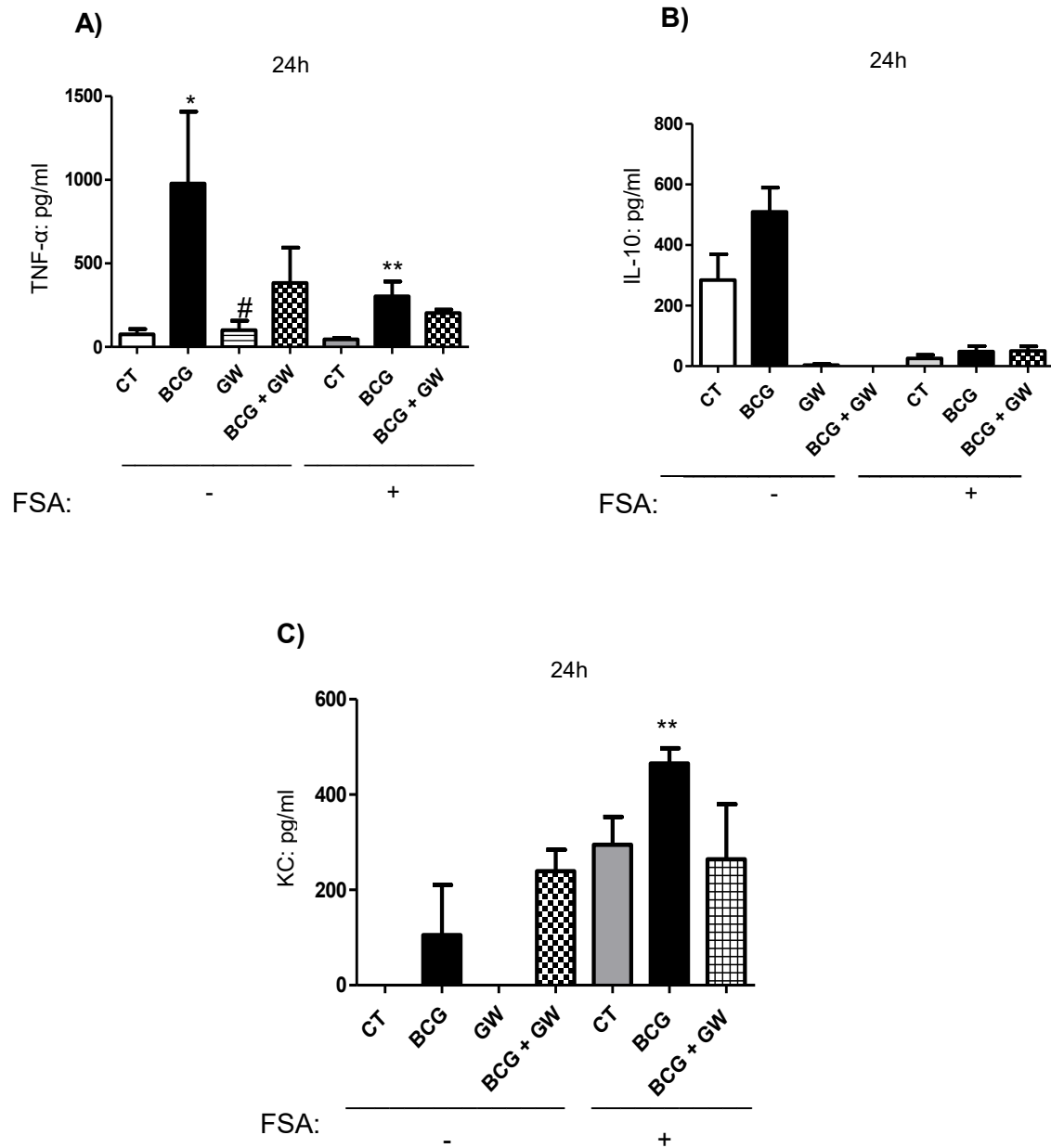
### **5.10 – SÍNTESE DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MEIO CONDICIONADO DE ADIPÓCITOS CONTENDO FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS (FSA), TRATADOS COM GW9662**

O perfil das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, e da quimiocina KC, envolvida na migração de neutrófilos foi avaliado, após estímulo dos macrófagos peritoneais com FSA, tratamento com o antagonista de PPAR $\gamma$  e infectados com BCG.

A figura 24 mostra que, a produção de TNF- $\alpha$  foi significativo diante da infecção com BCG, mas modulada negativamente diante do tratamento com GW 9662. Além disso, a síntese dessa citocina pró inflamatória foi modulada negativamente na presença de estímulo com FSA e infecção (Figura 26 A), enquanto a síntese de IL-10 nessas mesmas condições foi modulada positivamente (Figura 26 B). O estímulo com GW 9662, no entanto, pareceu não interferir na síntese de ambas essas citocinas inflamatórias, pois nenhuma diferença significativa foi encontrada, embora tenda a induzir um decréscimo de TNF- $\alpha$  na presença infecção por BCG e efeito inverso sobre a produção de IL-10.

Quanto aos níveis da quimiocina KC, podemos notar que a infecção com BCG induz uma maior síntese dessa citocina pelos macrófagos, no entanto, a presença de FSA potencializou a sua produção quando se compara a ambos os grupos não estimulados. O tratamento com GW, não interferiu novamente nos níveis de KC encontrados (Figura 26 C).

Figura 26



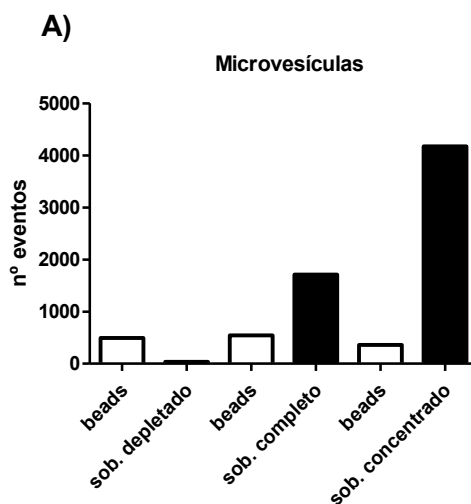
**Figura 26: Síntese de citocinas, TNF- $\alpha$  e IL-10, e da quimiocina KC, por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com FSA, tratados com GW 9662 e infectados ou não com BCG.** As análises foram feitas através do ensaio de Elisa. O estímulo com FSA é indicado com sinal +. (\*) Indica diferença significativa do grupo BCG em relação ao grupo controle, ambos sem estímulo com FSA; (\*\*) Indica diferença significativa entre o grupo BCG estimulado com FSA e BCG não estimulado com FSA. Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

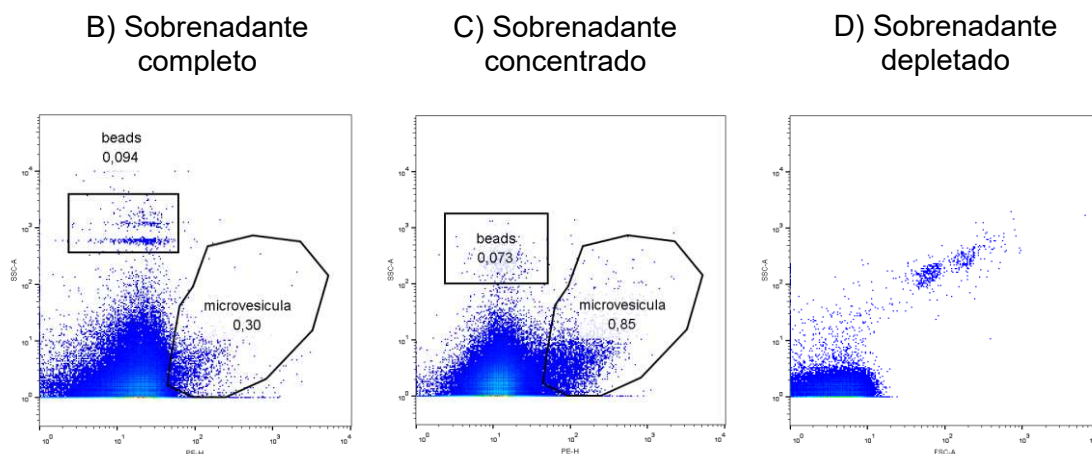
## 5.11 – ANÁLISE DE SUB-POPULAÇÕES DE VE'S

### 5.11.1 – CITOMETRIA DE FLUXO

A figura 27 A, compara a quantificação de MV's e exossomos no sobrenadante completo, concentrado e depletado, onde nota-se a diferença correspondente ao número de partículas encontradas em cada grupo. Além disso, de acordo com os gráficos correspondentes ao número total de eventos, na figura 27 B, podemos notar que no sobrenadante completo o número total de eventos correspondeu a 30% de microvesículas isoladas, enquanto o sobrenadante concentrado correspondeu a um total de 0,85% dos eventos, justificando-se pela concentração das microvesículas isoladas. No sobrenadante depletado não foi encontrado número significativo de VE's. Juntos, esses dados contribuem para a confirmação do isolamento das microvesículas.

Figura 27





**Figura 27: Análise por Citometria de fluxo de VE's.** As VE's foram marcadas com anexina. Número total de eventos (A); microvesículas isoladas de sobrenadante completo (B); sobrenadante concentrado (C); e sobrenadante depletado (D). B, C e D representam a porcentagem do número total de eventos. Os gates representam a quantidade de VE's positivas para Anexina V e com tamanho entre 100 – 1000nm.

### 5.11.2 – ANÁLISE DO TAMANHO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS

A população de exossomos (Figura 28 A) foi armazenada a 4°C (Figura 28 AA') e -80°C (Figura 28 AA''). Na temperatura de 4°C, o número de exossomos referente ao pico observado foi de 25% do total de partículas encontradas. Já na temperatura de -80°C, o número referente ao pico observado foi de aproximadamente 30%, não demonstrando grandes alterações no número de exossomos causadas por diferenças de temperaturas. No entanto, a qualidade da amostra foi melhor encontrada sob temperatura de -80°C (Figura 28 A'').

Para microvesículas (Figura 28 B) na temperatura de 4°C (Figura 28 BB'), o número de partículas referente ao pico observado foi de aproximadamente 20% do total de partículas encontradas. Já na temperatura de -80°C (Figura 28 BB''), esse número foi de aproximadamente 30%. Assim como para exossomos, não encontramos grandes alterações no número de microvesículas causadas por diferenças de temperaturas.

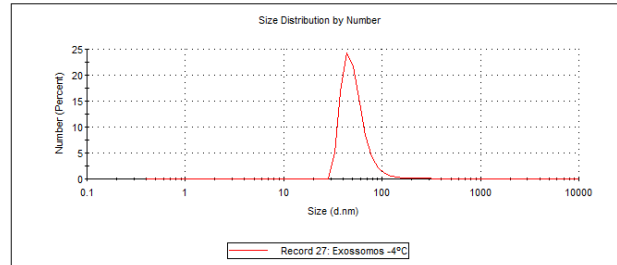


Figura 28

A)

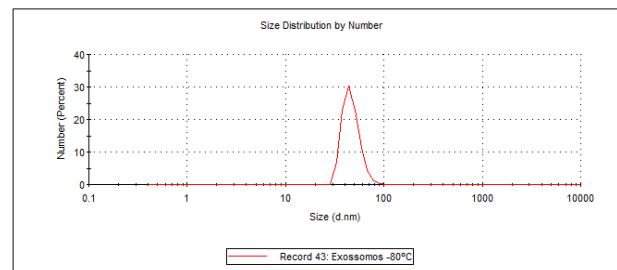
A')

Result quality : Refer to quality report



A'')

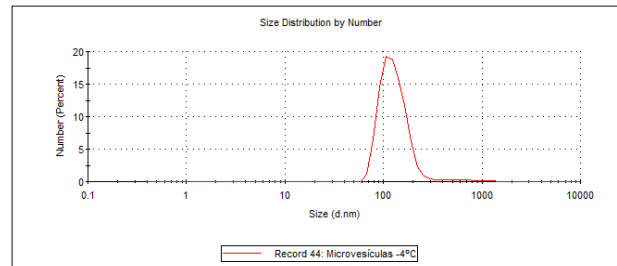
Result quality : Good



B)

B')

Result quality : Refer to quality report



B'')

Result quality : Refer to quality report

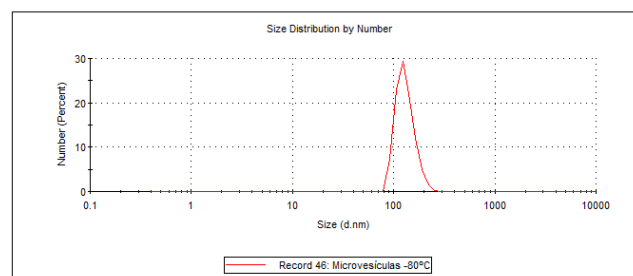


Figura 28: Identificação de subpopulações de VE's, exossomos (A) e microvesículas (B), por número. A' e B' correspondem, respectivamente, a exossomos e microvesículas armazenados a -4°

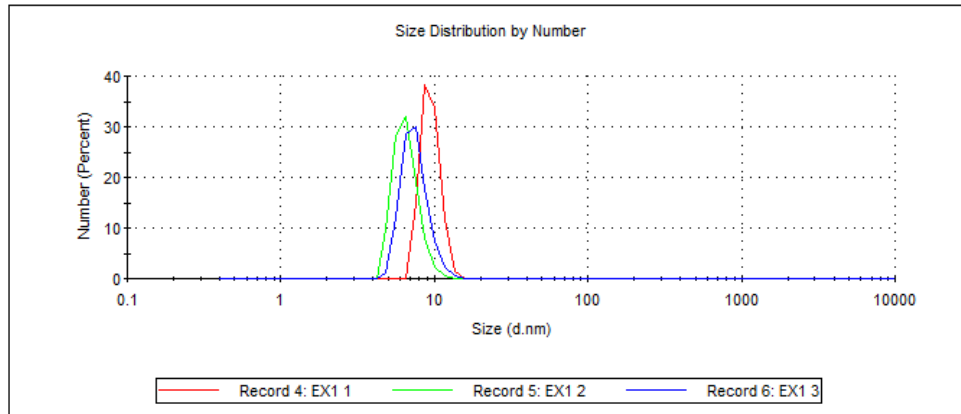
C. A'' e B'' correspondem respectivamente a exossomos e microvesículas armazenados a -80° C.

### **5.11.3 – PESQUISA DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NO MEIO RPMI CONTENDO 2% DE SORO FETAL BOVINO (FBS)**

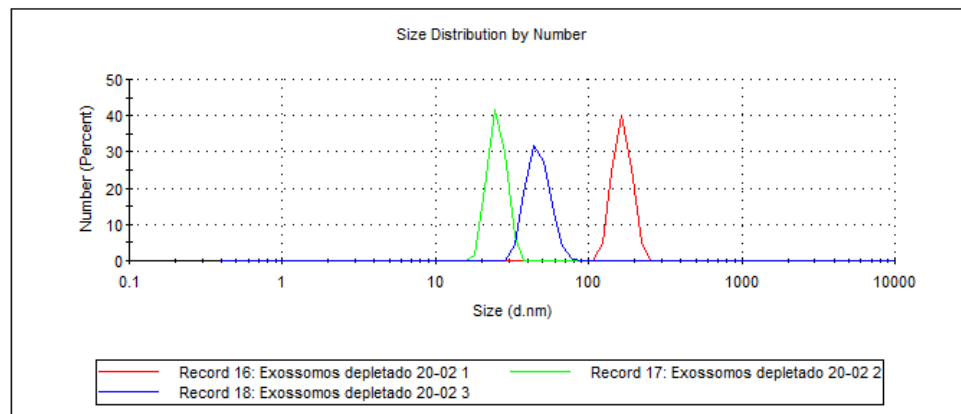
Podemos notar, que diferentemente da figura 29 A, que corresponde aos exossomos do sobrenadante de adipócitos, na figura 29 B, referente ao meio RPMI 2% SFB, observamos picos aleatórios de partículas encontradas no pellet, não sendo observados picos referentes ao tamanho de exossomos. O mesmo resultado se repete para microvesículas, onde, na Figura 29 C, observamos as MV's isoladas do sobrenadante, enquanto na Figura 29 D, não encontramos quantidade suficiente de MV's isoladas do meio RPMI 2% SFB. Além disso, ao submeter à mesma análise uma amostra de PBS, figura 29 E, também observamos picos aleatórios semelhantes àqueles encontrados em amostras de RPMI 2% FBS, confirmando a ausência de quantidades significativas de microvesículas e exossomos que pudessem comprometer a validação do experimento.

**Figura 29**

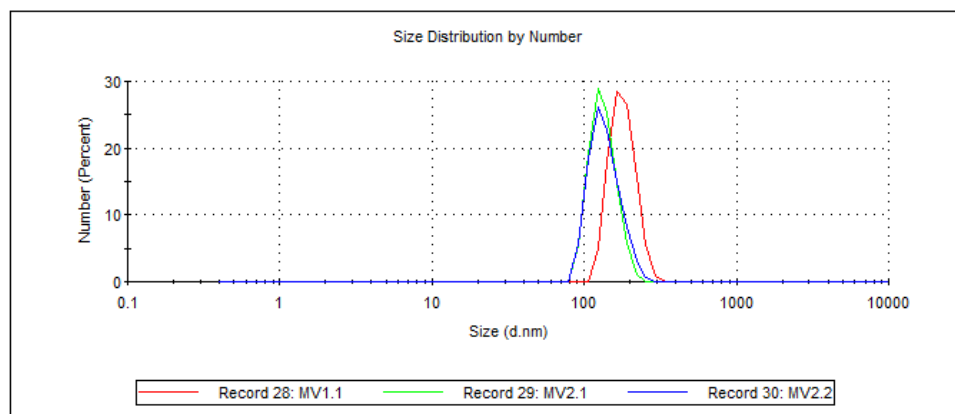
**A) Exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos**



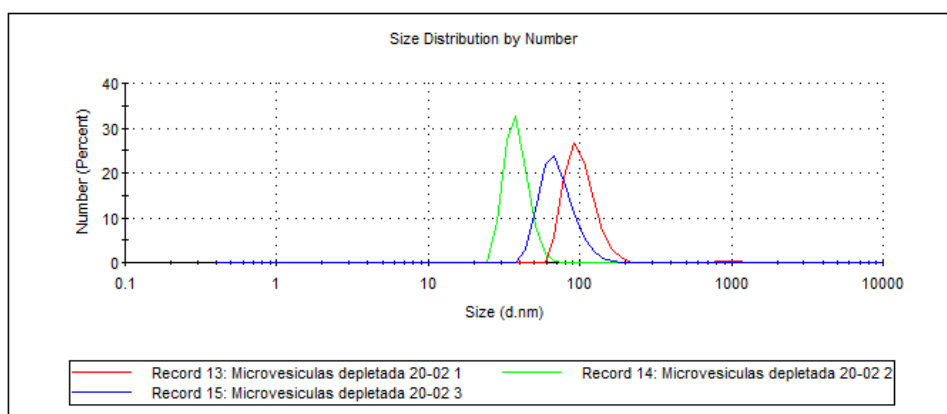
**B) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB**



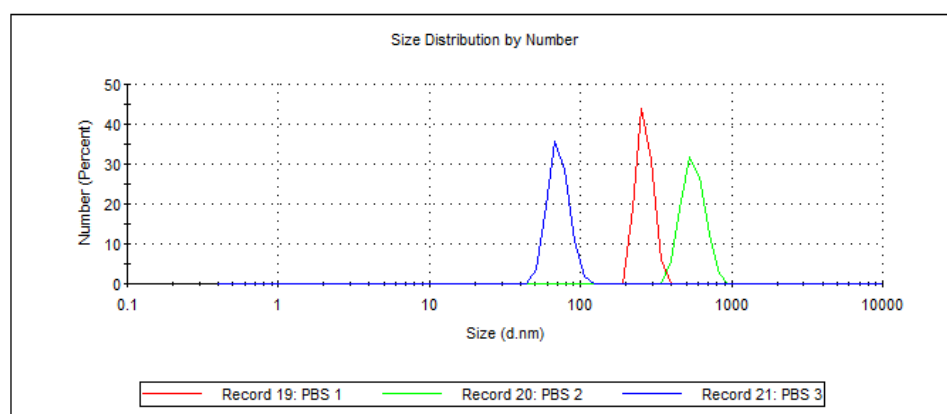
**C) Microvesículas isoladas do sobrenadante de adipócitos**



## D) Microvesículas isoladas do meio RPMI 2% SFB



## E) Amostra de PBS



**Figura 29: Quantificação e depletação de MV's e Exossomos do meio controle RPMI 2% SFB.** A) Exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos; B) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB; C) Microvesículas isoladas do sobrenadante de adipócitos; D) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB; E) PBS. Todas as amostras foram diluídas 1:9 em PBS.

#### 5.11.4 – ANÁLISE DO CONTEUDO PROTÉICO DAS AMOSTRAS DE FSA

Nós comparamos a carga protéica total das alíquotas de microvesículas e exossomos submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento:  $-4^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , por Nanodrop. Os resultados demonstram que a concentração de proteína pouco se altera com as variações da temperatura, nos levando a concluir que ambos os estoques de amostras podem ser utilizados como padrões para os experimentos de caracterização e estímulo com VE's.

**TABELA 1**

Amostra	Temperatura	Concentração protéica total	Amostra	Temperatura	Concentração protéica total
Exo. A	4°C	128 µg/ml	Exo. A	-80 °C	130 µg/ml
Exo. B	4°C	129 µg/ml	Exo. B	-80 °C	250 µg/ml
Mic. A	4°C	172 µg/ml	Mic. A	-80 °C	131 µg/ml
Mic. B	4°C	326 µg/ml	Mic. B	-80 °C	276 µg/ml

**Tabela 1: Quantificação protéica por Nanodrop:** Foram utilizadas duas amostras de experimentos de datas diferentes de diferenciação de adipócitos, A e B. O sobrenadante de adipócitos foi submetido a uma série de centrifugações e ultracentrifugações para isolamento das microvesículas e exossomos. Essas subpopulações foram divididas e aliqüotadas para armazenamento em duas temperaturas, -4°C e -80°C. Após o descongelamento, foram submetidas às análises por Nanodrop que se encontram na tabela. Exossomos (Exo.); microvesículas (Mic.).

Repetições experimentais foram feitas utilizando-se o kit Micro BCA, que é o mais recomendado para dosagem protéica da carga de microvesículas e exossomos. Todas as amostras foram descongeladas, vortexadas e submetidas e submetidas à dosagem de acordo com indicações do fabricante. A quantidade de proteína total encontrada em diversas diluições encontra-se na Tabela 2.

**TABELA 2**

Diluição	Temperatura	Microvesículas (média dos resultados)	Exossomos (média dos resultados)	Desvio padrão
1:1	-80 °C	92,989 µg/ml	129,537 µg/ml	14,5
1:50	-80 °C	63,491 µg/ml	80,578 µg/ml	2,5
1:100	-80 °C	44,550 µg/ml	67,703 µg/ml	8,4
1:500	-80 °C	20,022 µg/ml	32,293 µg/ml	3,0
1:1000	-80 °C	12,74 µg/ml	29,890 µg/ml	2,50

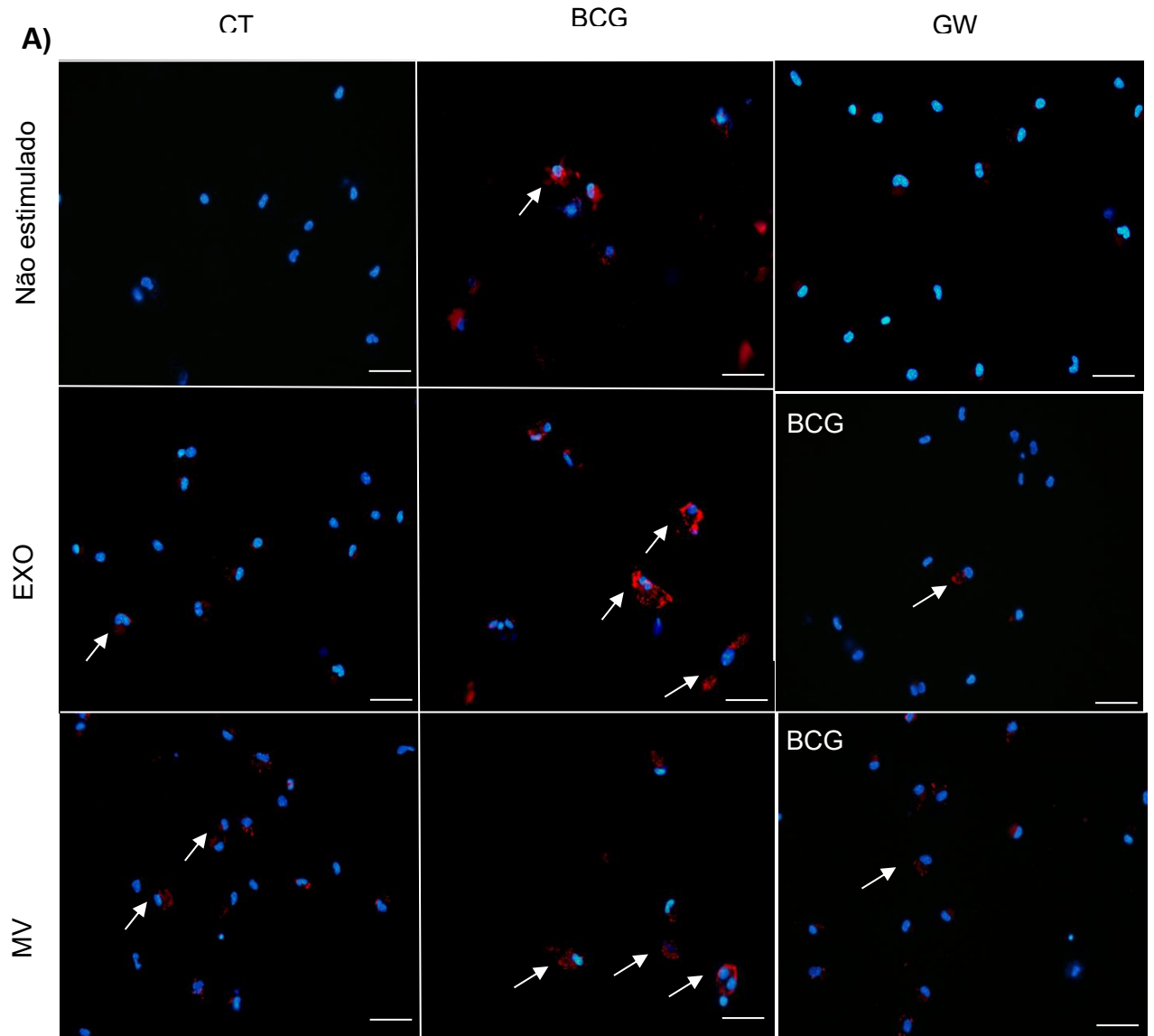
**Tabela 2: Quantificação protéica por Micro BCA:** Após as centrifugações para isolamento das microvesículas e exossomos, as amostras foram diluídas, aliqüotadas e armazenadas em -80°C. Para dosagem, foram descongeladas em gelo e submetidas à dosagem pelo kit Micro BCA de acordo com instruções do fabricante.

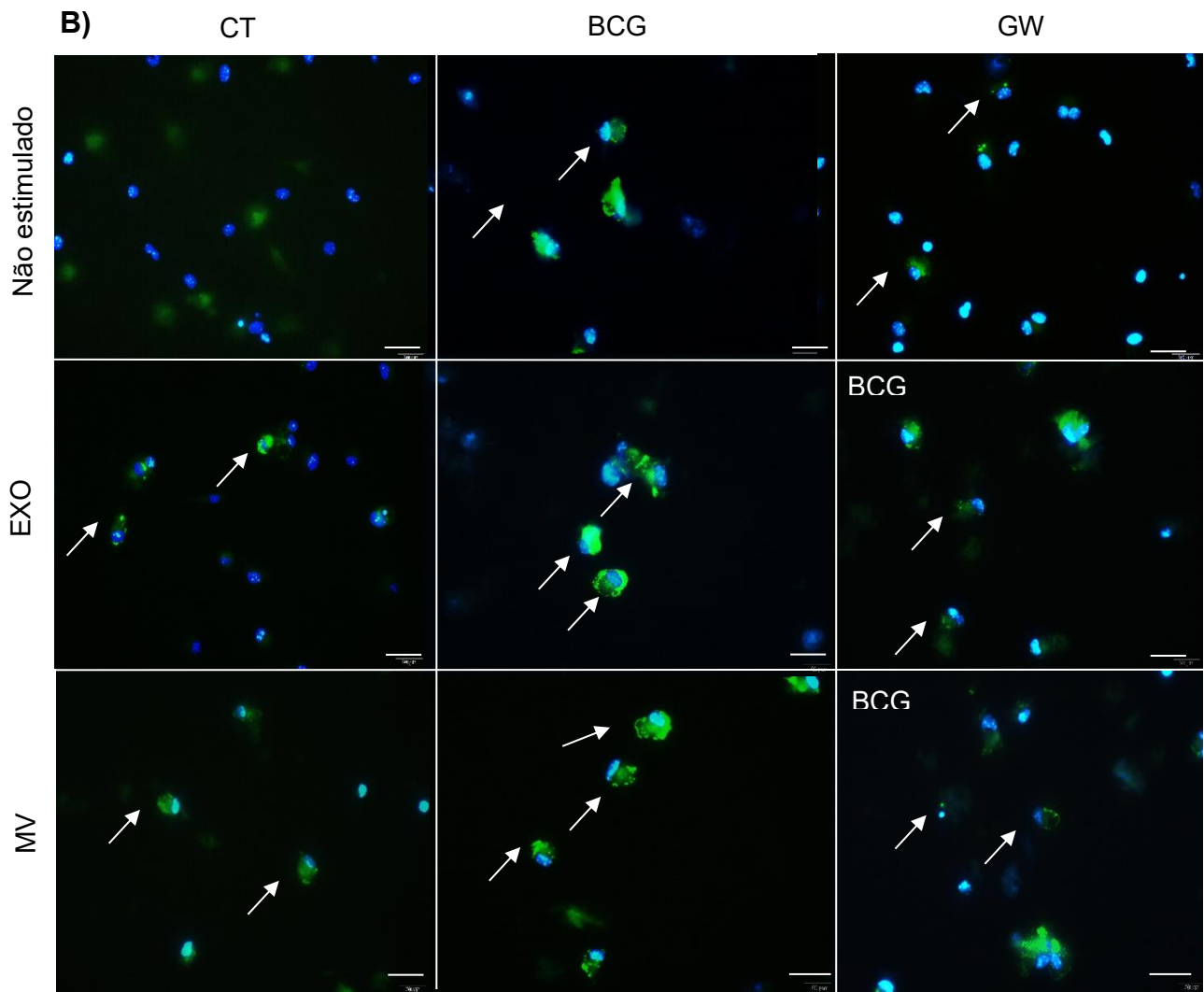
## **5.12 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium Bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MICROVESÍCULAS (MV's) OU EXOSSOMOS (EXO's)**

Dentre os fatores secretados por adipócitos presentes no sobrenadante, podemos encontrar vesículas extracelulares liberadas por essas células, mais precisamente microvesículas e exossomos, que participam de processos que envolvem a sinalização celular entre adipócitos e macrófagos, sendo esse estudo fonte de investigação intensa. Dessa forma, essas subpopulações de VE's foram isoladas, purificadas do sobrenadante de adipócitos e utilizadas como estímulo de macrófagos peritoneais, após serem ajustadas para a concentração de uso.

A infecção com BCG potencializou a formação de corpúsculos lipídicos na presença de ambos os estímulos com microvesículas ou exossomos e em concentrações de 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, quando se compara ao grupo BCG não estimulado com VE's. Mesmo o tratamento com MV's ou exossomos na ausência de infecção também já foi capaz de induzir a biogênese de corpúsculos quando se compara ao grupo controle não infectado e não estimulado (Figura 30 e 31).

Figura 30

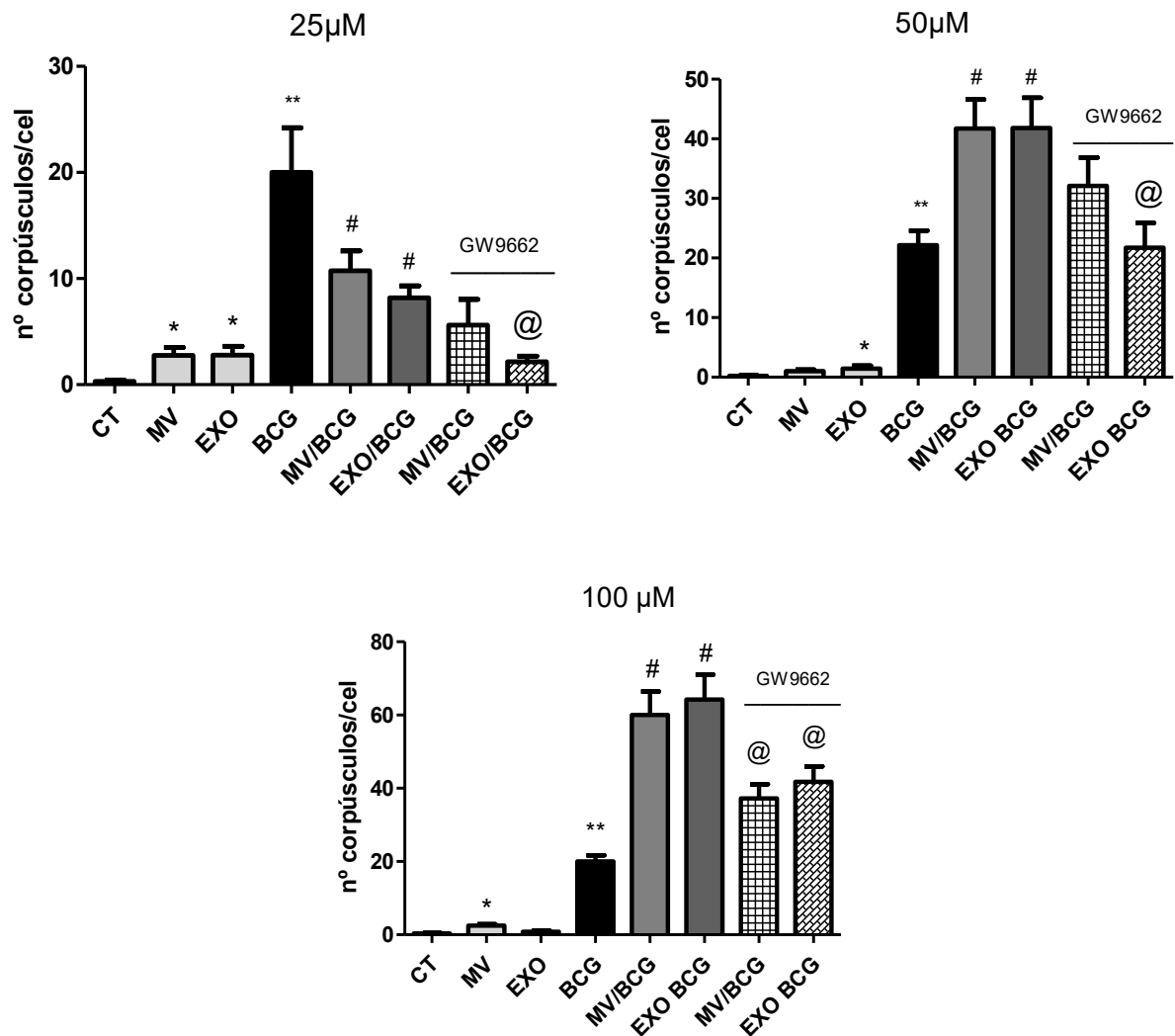




**Figura 30: Biogênese de CLs frente ao estímulo com 100  $\mu$ M Microvesículas (MV's) ou Exossomos (EXO).** (A) indica estímulos com a concentração de 50  $\mu$ M. (B) indica estímulos com a concentração de 100  $\mu$ M. Os corpúsculos lipídicos são indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI. Escala correspondente a 20  $\mu$ m, aumento de 40x.



Figura 31



**Figura 31: Quantificação de corpúsculos lipídicos após tratamento com microvesículas ou exossomos (25 μm, 50 μm, 100 μm).** Foram contados 50 núcleos por n. (\*) diferença significativa entre o grupo tratado e o controle. (\*\*) diferença entre grupos infectados. (#) diferença entre os grupos estimulado com Exossomos e controle; (##) diferença entre os grupos estimulado com microvesículas e controle. As colunas representam a média ± erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

### 5.13 – SÍNTESE DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS

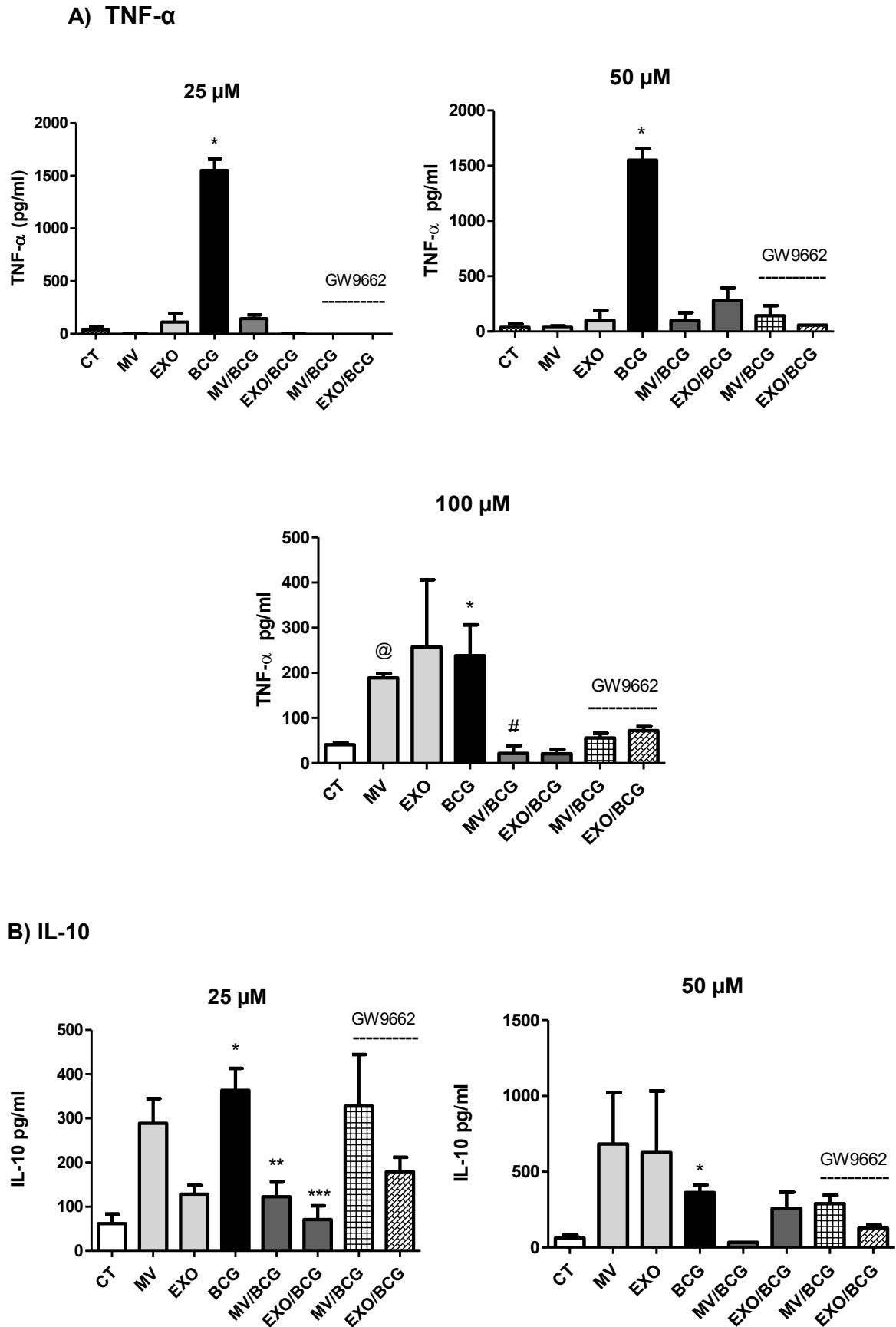
O perfil das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 32 A) e IL-10 (Figura 32 B), após tratamento dos macrófagos peritoneais com microvesículas ou exossomos isolados do FSA foi investigado.

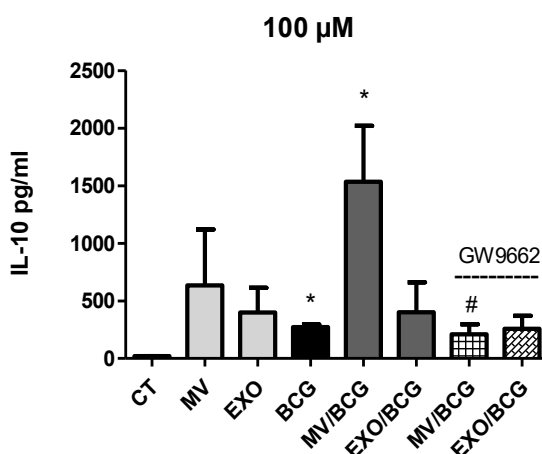
A produção de TNF- $\alpha$  foi alta diante do estímulo com BCG, no entanto, a presença

de microvesículas ou exossomos modulou negativamente sua produção, nas três concentrações observadas (Figura 32 A). Interessantemente, na concentração de 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , o estímulo somente com microvesículas ou com os exossomos foi capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, na mesma proporção que a infecção com BCG. Além disso, os grupos infectados e estimulados com MV's ou EXO's que foram tratados com GW9662, tiveram baixa produção de TNF- $\alpha$ , efeito este que foi similar aos grupos tratados infectados com BCG e tratados com MV's ou EXO's.

Já a síntese de IL-10 foi alta nos grupos tratados com MV's ou EXO's, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas com relação ao grupo controle. A infecção com BCG induziu a produção dessa citocina, quando comparada ao grupo controle. Entretanto, somente na concentração de 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  foi observada uma potencialização da produção de IL-10 no grupo infectado tratados com MV's ou EXO's. Nas concentrações de 25  $\mu\text{M}/\text{mL}$  a produção de IL-10 foi modulada negativamente e na concentração de e 50  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , não houve diferença significativa entre os grupos infectados, e infectados e estimulados com MV's e EXO's. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao tratamento com GW9662.

Figura 32





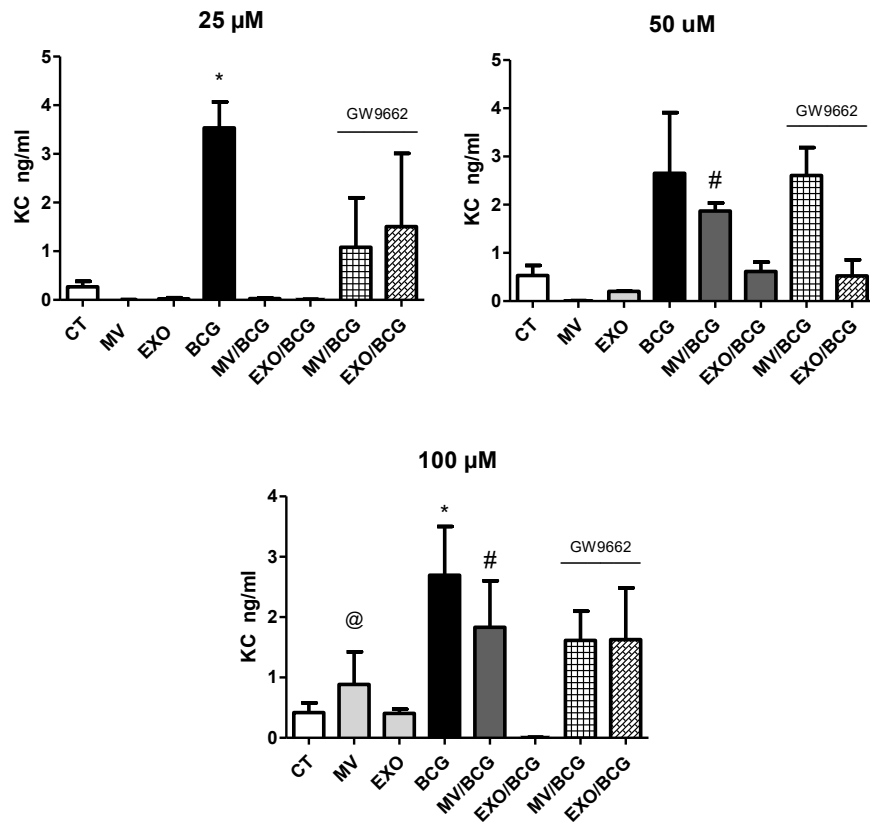
**Figura 32: Síntese das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com microvesículas ou exossomos em três concentrações distintas.** (A) Síntese de TNF-  $\alpha$ ; (B) Síntese de IL-10. As análises foram feitas através do ensaio de Elisa. (\*) Indica diferença significativa do grupo infectado para o grupo controle. (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença significativa do grupo infectado estimulado para o grupo somente infectado. (#) Indica diferença significativa entre o grupo MV infectado e não infectado. Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

#### 5.14 – SÍNTESE DE KC POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS

O perfil da quimiocina KC, envolvida na migração de neutrófilos, após tratamento dos macrófagos peritoneais com microvesículas ou exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos também foi avaliado.

Podemos notar que o grupo BCG induziu a produção desta quimiocina, que foi modulada negativamente na presença de MV's e EXOs na concentração de 25 Mm. Para as concentrações de 50 e 100 $\mu$ M, somente o grupo BCG na presença de EXOs modularam negativamente a produção de KC. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao tratamento com GW, apesar desta droga parecer reverter o papel atribuído às MVs e EXOs. Para melhores conclusões, os experimentos serão repetidos (Figura 33).

Figura 33



**Figura 33: Síntese de citocinas de KC por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com 100μM microvesículas ou exossomos e infecção por BCG. (\*\*\*) Indica diferença significativa entre o grupo estimulado com microvesículas e infectado com BCG e o grupo apenas infectado estimulado com MV's. As colunas representam a média ± erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .**

## 5 – DISCUSSÃO

Diante da necessidade de se elucidar os mecanismos e sinais moleculares envolvidos na interação entre adipócitos e macrófagos infectados por patógenos intracelulares, esse trabalho traz como contribuição um melhor entendimento sobre como processos inflamatórios e o metabolismo lipídico são afetados pela comunicação entre essas células durante a patogênese micobacteriana.

Começamos investigando se o meio condicionado de adipócitos, contendo uma ampla variedade de fatores solúveis secretados (FSA), seria responsável por alterações no perfil macrofágico durante a patogênese micobacteriana *in vitro*. De acordo com Suganami et al. 2005, a co-cultura de adipócitos diferenciados a partir da linhagem NIH3T3-L1 e macrófagos da linhagem RAW264 resulta na regulação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e MCP-1. Tais alterações inflamatórias são induzidas em co-cultura sem contato entre as células, sugerindo o papel de fatores secretados por adipócitos (Suganami et al. 2005). Muitos podem ser os fatores envolvidos na comunicação entre adipócitos e macrófagos em um ambiente de metainflamação, como citocinas e adipocinas – TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , leptina, a adiponectina, a adiposina, a resistina, o PAI-1, IGF-1, MCP-1, a visfatina, entre outros, contribuindo juntos para a inflamação do tecido adiposo com indução de um perfil pró-inflamatório em macrófagos (Lafontan et al. 2005; Engin et al. 2017).

Para analisar se este perfil se manteria *in vitro* e diante da infecção por *M. bovis* BCG, nós estabelecemos a cultura de pré-adipócitos, induzindo à diferenciação (Figura 14). Após a coleta do sobrenadante dos adipócitos diferenciados contendo FSA, nós estimulamos os macrófagos infectados ou não e avaliamos o efeito sobre a formação de corpúsculos lipídicos, síntese de citocinas, adipocinas e expressão de PPAR $\gamma$ .

Vários trabalhos têm demonstrado que os corpúsculos lipídicos estão relacionados ao processo inflamatório, quando a partir de estímulos infecciosos, um aumento em número e tamanho é observado, ver revisão (Bozza e Bandeira-Melo, 2005, Bozza et al., 2009). Macrófagos que acumulam grandes quantidades de corpúsculos lipídicos (chamados macrófagos espumosos) têm sido caracterizados durante infecções micobacterianas como por *Mycobacterium tuberculosis* (Cardona et al. 2000; Peyron et al., 2008), *M.bovis* BCG (D'Avila et al, 2008; Almeida et al, 2009;

Almeida et al. 2014) e por *Mycobacterium leprae* (Mattos K. A. et al. 2010; Mattos K. A. et al. 2012), como estratégia intracelular eficaz para adquirir lipídios e modular a resposta imune, a fim de favorecer a sobrevivência micobacteriana.

Nossos resultados apontam que a infecção por BCG com MOI 5:1, induziu a biogênese de corpúsculos lipídicos, sendo que este aumento foi potencializado na presença de sobrenadante (Figura 15 e 16). Assim, sugerimos que o meio condicionado de adipócitos contém fatores solúveis importantes que exercem efeitos sobre o metabolismo lipídico em macrófagos, podendo favorecer o mecanismo de escape induzido pelas micobactérias a fim de favorecer sua sobrevivência no interior dos macrófagos.

Nosso grupo vem estudando o papel funcional da ativação PPAR $\gamma$  durante a infecção por *M. bovis* BCG, a partir do uso de agonista específico (BRL49653) ou antagonista (GW9662) para o receptor. BRL49653 potencializou a formação de corpúsculos lipídicos bem como a produção de mediadores lipídicos como a PGE<sub>2</sub> por macrófagos infectados com BCG em 24 h *in vitro*, enquanto o pré-tratamento com o antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662, inibiu a biogênese de CLs e a produção de PGE<sub>2</sub> (Almeida et al. 2009; Davila et al. 2006). Isso indica um papel fundamental da sinalização de PPAR $\gamma$  no metabolismo lipídico de macrófagos durante a infecção por BCG (Almeida et al. 2009). O *M. tuberculosis* também é capaz de desencadear uma maior expressão de PPAR $\gamma$  em macrófagos *in vitro* (Rajaram et al. 2010; Almeida et al. 2009) e *in vivo*, (Lagranderie et al. 2010). *M. smegmatis*, não patogênica e de crescimento rápido, no entanto, não foi capaz de induzir a expressão de PPAR $\gamma$  em macrófagos, sugerindo que a expressão de PPAR $\gamma$  pode estar relacionada à patogênese bacteriana (Rajaram et al. 2010; Almeida et al. 2009).

Além disso, a infecção por BCG falhou em induzir a expressão de PPAR, formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE<sub>2</sub> e geração de TNF- $\alpha$  em macrófagos de camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, enquanto em camundongos TLR2<sup>+/+</sup>, a expressão de PPAR $\gamma$  após 24 h de infecção *in vitro* foi aumentada. Assim, sugere-se um papel fundamental da sinalização de TLR2, assim como da coexpressão de CD36 em regiões de balsas lipídicas, na formação de corpúsculos lipídicos, através de vias dependentes de PPAR $\gamma$  e independentes de NF- $\kappa$ B, com modulação negativa da resposta dos macrófagos (Davila et al. 2006; Almeida et al. 2009; Almeida et al. 2012; Almeida et al. 2014). Estudos com *M. leprae*, também demonstraram que a biogênese de CLs induzida pela infecção foi correlata com o aumento da secreção de PGE<sub>2</sub> e IL-

10, bem como redução da produção de IL-12 e NO em células de Schwann infectadas por *M. leprae*.

Além disso, nosso grupo demonstrou que patógenos intracelulares como o *M. bovis* BCG, pode induzir um mecanismo de escape a partir formação de corpúsculos lipídicos, regulando a via de sinalização celular do receptor nuclear PPAR $\gamma$  e transrepressão da via do NF- $\kappa$ B (Almeida 2009, Almeida et al. 2014). Assim, analisamos a expressão de PPAR $\gamma$  em tempos de 6, 24 e 48 horas de infecção (Figura 23). A expressão deste receptor ocorreu em maiores níveis nos grupos infectados, sendo potencializada no grupo que recebeu estímulo com FSA na presença de infecção por BCG. Tal efeito correlaciona-se ao aumento da biogênese de CL's anteriormente observada e indica um possível efeito de fatores secretados por adipócitos na expressão de PPAR $\gamma$ . Para confirmar melhor esse dado, nós suprimimos a atividade de PPAR $\gamma$  através do uso do seu antagonista GW9662. Com isso, foi observada uma diminuição da formação de corpúsculos lipídicos nos grupos tratados com GW 9662 durante a infecção com BCG (Figura 24 e 25), tanto na ausência como na presença de FSA, sugerindo também uma possível diminuição da expressão de PPAR $\gamma$ .

A ativação do PPAR pode inibir vias NF- $\kappa$ B e MAPK, duas das mais importantes sinalizações vias que regulam as respostas pró-inflamatórias desencadeadas pela ativação de TLR (Ogawa et al. 2005; Desreumaux et al. 2001). A infecção por BCG aumentou significativamente a síntese de MIP-1, IL12p70, IL-6 e TNF- $\alpha$  dentro de 24 h. O pré-tratamento com GW9662 não conseguiu modificar a produção de citocinas por macrófagos infectados com BCG (Almeida et al. 2014). Em nosso trabalho, escolhemos duas citocinas de perfil pró e antiinflamatório, para verificar uma possível polarização dos macrófagos infectados e estimulados com FSA. De acordo com nossos resultados a citocina IL-10, de perfil anti-inflamatório, foi aumentada no grupo infectado na presença de FSA, enquanto a citocina de perfil pró-inflamatório TNF-  $\alpha$ , teve uma menor produção ao se comparar os mesmos grupos (Figura 19 A e B). Esse resultado reforça a ideia de que a infecção por *M. bovis* BCG pode estar sendo favorecida na presença de fatores secretados por adipócitos.

Além de citocinas, a produção de adipocinas pelo tecido adiposo desempenha função-chave nas complicações cardiometabólicas induzidas pela obesidade: o tecido adiposo é o principal produtor da leptina e a adiponectina é o peptídeo mais abundante secretado pelos adipócitos (Achari and Jain 2017). A leptina regula ingestão de



alimentos e gasto energético e, em obesos, seus níveis séricos encontram-se aumentados. Enquanto isso, a diminuição dos níveis de adiponectina está negativamente correlacionada com marcadores de inflamação subclínica crônica na obesidade (Engin et al. 2017). Em nossas análises, não foram encontrados níveis significantes de leptina em nenhum dos grupos e tempos analisados (dados não mostrados). Interessantemente, a cultura de macrófagos estimulados com FSA, levou ao aumento exacerbado da produção de adiponectina. Tal efeito foi inibido diante da presença de infecção com *Mycobacterium bovis* BCG (Figura 21), efeito que foi semelhante ao observado no trabalho de Inafuku et al. 2015. Para compreender o efeito do BCG na resistência insulínica, Inafuku e colaboradores avaliaram os níveis séricos de adiponectina de alto peso molecular (HMW), preditora da resistência insulínica. A proporção de HMW para adiponectina total no grupo BCG foram significativamente maiores em comparação com o grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de adiponectina não-HMW entre os grupos experimentais. A administração de BCG reduziu os níveis de insulina no soro, mas não afetou os níveis de glicose no soro em camundongos ob / ob (Inafuku et al. 2015). Inicialmente, pensava-se que a adiponectina fosse produzida exclusivamente pelo tecido adiposo. No entanto, mais tarde diferentes grupos de pesquisa, demonstraram que a adiponectina é expressa também em outros tecidos, incluindo osteoblastos (Berner et al. 2004), células do parênquima hepático (Yoda-Murakami et al. 2001), miócitos (Delaigle et al. 2004), células epiteliais (Patel et al. 2008) e tecido placentário (Camino et al. 2005).

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos perante ativação e estímulo de infecções, é também um marcador de polarização macrofágica (Caruso et al. 2017; Tsikas et al. 2017; Mantzaris et al. 2017). O NO é uma espécie reativa de oxigênio com propriedades antioxidantes, com funções importantes na defesa do hospedeiro (Gal et al. 2002). Nossos resultados demonstraram que a concentração de nitrito, medida indireta da produção de NO, foi estatisticamente diferente entre os grupos infectados e controles após 24 horas de infecção e estímulo com FSA. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo infectado e o grupo infectado na presença de fatores solúveis secretados por adipócitos, demonstrando possivelmente que a presença de FSA não interfere na produção de NO pelos macrófagos infectados (Figura 22).

Os resultados mostrados até agora apontam possíveis efeitos moduladores de

fatores secretados por adipócitos sobre o fenótipo e função de macrófagos. Assim, a segunda parte deste trabalho foi o estudo e a caracterização de tais fatores solúveis presentes no meio condicionado de adipócitos, para avaliar mais especificamente seus efeitos na função macrofágica.

Vesículas extracelulares (VEs) são propostas como mediadoras na comunicação intercelular para eventos de sinalização de curto e longo alcance (Simons et al. 2009; Balaj et al. 2011; Cossetti et al. 2014). São mediadoras da comunicação intercelular entre diversas células, como em macrófagos e adipócitos, exercendo um papel na interação parácrina entre células a partir de um mecanismo chave na inflamação do tecido adiposo que leva a complicações metabólicas (Pardo et al. 2018; Camino et al. 2020; Akbar et al. 2019; Kim, Shah, and Nakamura 2018). Além disso, VE's também podem modular a resposta imune através da indução de corpúsculos lipídicos, como ocorre na infecção por *Trypanosoma cruzi* (Lovo-Martins et al. 2018).

Dessa forma, buscamos investigar se as Vesículas Extracelulares liberadas por adipócitos exerciam algum efeito na função macrofágica, através da sua presença no meio condicionado de adipócitos. Para atender aos requisitos da ISEV para estudos das vesículas extracelulares (MISEV ou MISEV2014) estabelecemos métodos de isolamento e caracterização para depois realizarmos os estudos funcionais. A partir de análises de citometria de fluxo, marcação com Anexina V e padronização com beads, demonstrou-se que o isolamento de microvesículas foi eficiente (Figura 27), e a morfologia da população corrobora com estudos anteriores (Szatanek et al. 2017; Konoshenko et al. 2018).

Para confirmações referentes ao tamanho das subpopulações de VE's, utilizamos o software Zeta Sizer, e eliminamos as possíveis interferências no experimento, como temperatura de armazenamento e quantidade de soro fetal bovino (Figuras 28). A temperatura poderia afetar a estabilidade, número de partículas, agregação e função, causando deformidades e trazendo alterações em seu tamanho (Yuana et al. 2015; Muller et al. 2014; Vila-Liante et al. 2006; Lőrincz et al. 2014; Maroto et al. 2017). Ao analisar o número e carga protéica total de microvesículas e exossomos encontrados em diferentes temperaturas de armazenamento após um processo de homogeneização, não foram encontradas variações referentes à temperatura de armazenamento que pudesse comprometer o experimento (Tabela 1 e 2). Os picos encontrados nas análises por Zeta Sizer correspondem ao tamanho esperado de exossomos e microvesículas, corroborando com os resultados observados em

estudos anteriores de análise pela mesma técnica através de Zeta Sizer e por técnica de difusão dinâmica da luz (Figura 16 e 17) (DLS) (Szatanek et al. 2017; Maroto et al. 2017; Li et al. 2017; They et al. 2006). Análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão e por proteômica serão futuramente realizadas para caracterização ultraestrutural e do conteúdo protéico das microvesículas e exossomos.

Para investigar se as VE's seriam capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais frente a infecção por BCG, assim como observado na infecção por *T. cruzi*, nós estimulamos os macrófagos peritoneais *in vitro* com microvesículas e exossomos e posteriormente infectamos com *M. bovis* BCG. Como a literatura é controversa quanto à quantidade ideal a ser utilizada como estímulo, nós escolhemos três concentrações, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Nossos resultados demonstraram que o estímulo de macrófagos com microvesículas e exossomos purificados induziram uma maior biogênese de CL's, efeito que foi potencializado na presença de infecção com BCG (Figura 30 e 31). Essa análise se mostrou condizente com os resultados encontrados nos experimentos com FSA. No entanto, o efeito pareceu ser menor nos experimentos com microvesículas e exossomos (Figura 30 e 31).

Muitos efeitos protetores têm sido atribuídos às VE's. Propriedades anti-inflamatórias foram observadas em diferentes estudos: após lesão muscular induzida por cardiotoxina (Sicco, C. L. 2017), efeito antimicrobiano em fagócitos (Oliveira et al., 2010), efeitos protetores em doenças neurodegenerativas e câncer (Gangoda et al. 2015), além de um papel como carreadoras de fatores de virulência (Rodrigues et al., 2008) e anticorpos em infecções fúngicas (Albuquerque et al., 2008; Vargas et al., 2015; Gil-Bona et al., 2015). Contudo, na infecção por *T. cruzi*, um aumento da parasitemia, aumento do parasitismo cardíaco, diminuição do óxido nítrico (NO) plasmático, redução da produção de NO pelas células do baço e modulação da produção de citocinas, com redução do TNF- $\alpha$  no plasma e diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelas células do baço de animais infectados foram observados, indicando que as EVs Y modulam a resposta do hospedeiro a favor do parasito com participação de corpúsculos lipídicos (Lovo-Martins et al. 2018).

Além disso, muitos trabalhos têm documentado a participação de vesículas extracelulares na resposta inata e adaptativa, além de um potencial terapêutico na moderação da morbidade e mortalidade de infecções, como na COVID-19 e infecções

por HIV (Kormelink et al., 2018; Mazini, Rochette, and Malka 2021; Srinivasa et al. 2021; Ratajczak et al. 2021). Exossomos de ADSCs carregam diversas moléculas com propriedades imunomoduladoras que podem participar da imunomodulação como TGF- $\beta$ , GDF-11, HGF, NGF, IGF, IL-1, IL-6, TLR-2, TLR-4, INF- $\gamma$  e um painel de miRNAs totalmente secretados dentro de seus exossomos (Mazini et al. 2019; 2020).

Trabalhos anteriores também demonstraram que exossomos liberados de células J774 infectadas com *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. bovis* BCG, células THP-1 e células RAW264.7 podem induzir macrófagos de camundongos a liberar citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , e iNOS (Bhatnagar et al. 2007; Giri et al. 2010; Prados-Rosales et al. 2011; Singh et al. 2012). Além disso, exossomos presentes no soro de camundongos infectados com *M. bovis* BCG também podem promover a expressão de fatores inflamatórios nestas células (Singh et al. 2012). Os exossomos podem promover a fosforilação de p38 e I $\kappa$ B em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (Bhatnagar et al. 2007), sugerindo que fatores transcricionais como o p38 e I $\kappa$ B também estão envolvidos na produção de citocinas inflamatórias (Yan et al. 2021).

Recentemente, Liu e colaboradores também demonstraram que a infecção por *M.tb* foi capaz de promover a produção e liberação de exossomos por MSCs, mas não influenciou na proliferação celular. Os exossomos derivados de MSCs infectados com *M.tb* foram internalizados por macrófagos e então induziram uma resposta pró-inflamatória por meio do aumento da produção de TNF- $\alpha$ , RANTES e iNOS. Além disso, o estudo mostrou que o efeito de Exo-MSCs-*M.tb* foi mediado por vias dependentes de TLR2/4 e MyD88 (Liu et al. 2021).

Para verificar o efeito da infecção com *M. bovis* BCG, sobre o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos estimulados com VEs, nós dosamos as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, nas três concentrações de VEs. Nós analisamos que os estímulos com MVs ou EXOs modularam negativamente a secreção de TNF- $\alpha$  nos grupos infectados e estimulados, quando comparado ao grupo infectado somente. No entanto, o estímulo com MVs ou EXOs não associado à infecção também foi capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$ , principalmente na concentração de 100  $\mu$ M/mL.

Quanto à produção de IL-10, citocina de perfil anti-inflamatório, somente a concentração de 100  $\mu$ M/mL foi capaz de potencializar sua produção, comparando-se ao grupo BCG não estimulado. Na concentração de 25  $\mu$ M/mL, o estímulo com MVs modulou negativamente a produção de IL-10, sendo que na concentração de 50

$\mu\text{M/mL}$  não foram observadas diferenças significativas com relação aos grupos infectados, e infectados e estimulados.

É importante destacar, que células infectadas por patógenos intracelulares também podem liberar VEs, as quais exercem um papel imunomodulador sobre a função de outras células, regulando por exemplo a apresentação de antígenos e a resposta imune adaptativa. Assim, foi demonstrado que a infecção com *M.tb*, também pode aumentar modificar o rendimento da secreção de exossomos e alterar a composição protéica das VEs liberadas pelas células hospedeiras [21; Diaz et al. 2016) como observado para Hsp90, vimentina, Coronin 1 C e moesina, as quais tiveram os níveis aumentados após a infecção por *Mtb* [22].

Além disso, o próprio *M.tb* pode liberar vesículas, que são denominadas vesículas bacterianas (VBs) (Lee et al. 2015; Jurkoshek et al. 2016). As VBs são ricas em antígenos como SodB, EsxN e Ag85b (Lee et al. 2015; Jurkoshek et al. 2016), sendo que a composição proteica dos VBs é diferente daquela do próprio *M.tb*. As VEs liberados por células infectadas com *Mtb* ou *M. bovis* BCG podem carrear: proteínas do *M.tb* como LAM (Jurkoshek et al. 2016; Bhatnagar et al. 2007; Athman et al. 2015), o complexo Ag85 (Giri et al.2008; Giri et al. 2010), lipoproteínas (LpqH e LprG) (Smith et al. 2017; Athman et al. 2015) e lipoproteínas de 19 kDa (Bhatnagar et al. 2007; Giri et al. 2010). Essas vesículas bacterianas podem desencadear uma resposta inflamatória após serem internalizadas por APCs. Além disso, as VBs podem induzir a migração de monócitos, neutrófilos e linfócitos tanto em ensaios *in vivo* quanto *in vitro* (Singh et al. 2012; Yan et al. 2021).

Macrófagos da medula óssea derivados de camundongos C57BL / 6 tratados com exossomos liberados de células RAW264.7 infectadas com *M.tb* secretam níveis significativos de quimiocinas e podem induzir a migração de macrófagos e esplenócitos marcados com CFSE (Singh et al. 2012). Neste estudo nós dosamos os níveis a quimiocina KC, produzidas por macrófagos estimulados com VEs e infectados ou não com BCG, nós observamos que apenas as microvesículas foram capazes de induzir um aumento da produção e secreção desta citocina, efeito que foi modulado negativamente pela infecção com BCG (Figura 32).

Micro RNAs exossômicos (miRNAs) carregados por VEs, também tem sido descrito como mediadores da comunicação celular, podendo transferir informações biológicas entre células e tecidos e atuando como potenciais biomarcadores em muitas doenças. O estudo de Alipoor e colaboradores avaliou o perfil de miRNA de exossomos

secretados por macrófagos derivados de monócitos humanos após infecção com *M. bovis* (BCG), dentre eles, miR-1224, -1293, -425, -4467, -4732, -484, -5094, -6848-6849, -4488 e -96, todos os quais estavam envolvidos na modulação do metabolismo celular e produção de energia (Alipoor et al. 2017).

As VEs transportam uma carga rica de DNA, RNA, proteínas, lipídios e metabólitos, refletindo sua origem celular e são liberados no espaço extracelular por vários tipos de células durante condições fisiológicas e patológicas (Théry et al. 2002; Cossetti et al. 2014).

Já foi demonstrado que corpúsculos lipídicos podem estar presentes em exossomos derivados de adipócitos, podendo exercer importantes papéis moduladores nas células receptoras (Flaherty et al. 2019). Assim, neste estudo nós sugerimos que microvesículas e exossomos derivados de adipócitos, bem como aquelas produzidas e secretadas pelos macrófagos infectados, podem corroborar para ativação celular, no que diz respeito ao metabolismo lipídico, secreção de citocinas e quimiocinas, num mecanismo de retroalimentação. Além disso, as VEs podem transportar proteínas, fatores de transcrição e até mesmo organelas, as quais são capazes de alterar o fenótipo de células hospedeiras durante infecções por patógenos intracelulares.

## 7- CONCLUSÃO:

Nossos resultados demonstram:

### Papel dos FSA:

- ✓ A infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG induziu uma maior formação de corpúsculos lipídicos, sendo esta biogênese potencializada pelo estímulo com FSA, em 6, 24 e 48 horas. Além disso na presença de GW 9662 este efeito foi inibido;
- ✓ A infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG induziu a produção de TNF- $\alpha$  que foi modulada negativamente na presença de FSA
- ✓ A infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG induziu a produção da citocina IL-10 e da quimiocina KC que foram potencializadas na presença de FSA;
- ✓ Macrófagos peritoneais produziram níveis significativos de adiponectina na presença de FSA e a infecção micobacteriana modulou negativamente esta produção;
- ✓ A expressão de PPAR $\gamma$  é induzida pela infecção com *M. bovis* BCG nos tempos de 6, 24 e 48 horas sendo potencializada pelo estímulo com FSA;

### Papel das microvesículas e exossomos:

- ✓ A infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG induziu uma maior formação de corpúsculos lipídicos, sendo esta biogênese potencializada na presença de MVs e EXOs;
- ✓ MVs e EXOs regulam negativamente a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados em todas as concentrações, sendo este efeito mantido na presença de GW;
- ✓ Na concentração de 25  $\mu$ M de MVs e EXOs, foi observada uma modulação negativa da produção de IL-10 pelos macrófagos infectados. No entanto, nenhum efeito significativo foi observado na presença de GW9662. Já na concentração de 100  $\mu$ M de microvesículas, foi observada uma maior produção de IL-10 pelos macrófagos infectados, sendo efeito inibido na presença de GW9662. Para exossomos, nenhuma diferença significativa foi observada.

- ✓ A infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG induziu a produção de KC que foi modulada negativamente na presença de 25  $\mu$ M de MVs e EXOs. Já nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M, apenas EXOs modularam negativamente a síntese desta quimiocina durante a infecção. Nenhum efeito significativo foi observado nos grupos estimulados com GW 9662, apesar deste tratamento parecer reverter parcialmente a inibição pelos EXOs.

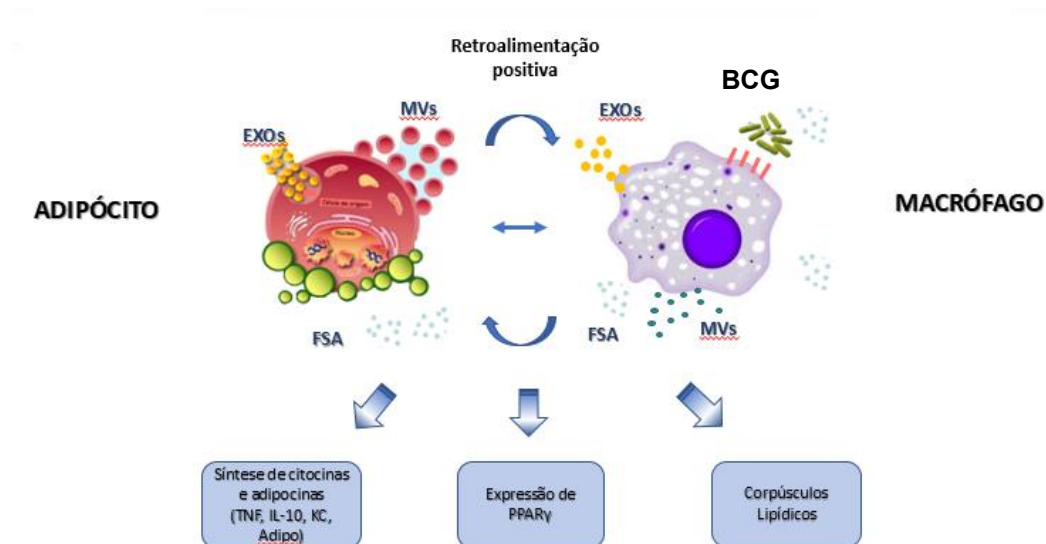
Assim, podemos notar os efeitos de VEs secretados por adipócitos sobre o papel dos macrófagos diante da infecção com BCG. Mais especificamente, esses efeitos são atribuídos à microvesículas e exossomos que vêm sendo descritos como medidores chave do sistema imunológico, podendo favorecer ou não infecções por patógenos intracelulares.

Como contribuição, nosso trabalho demonstrou importantes alterações no: metabolismo lipídico, expressão de PPAR $\gamma$  e síntese de citocinas, frente à infecção com *M. bovis* BCG.

Contudo, futuros estudos ainda deverão ser realizados para melhor elucidar os efeitos das VE's liberadas pelos tanto por adipócitos quanto por macrófagos infectados sobre células do sistema imunológico; e, futuramente, contribuir com terapias mais eficazes na resolução de infecções associadas à complicações da obesidade.



Figura 34



**Figura 34: Modulação de macrófagos infectados com *M. bovis* BCG por FSA, MV's ou Exossomos.** FSA são reconhecidos por macrófagos infectados levando a alterações no metabolismo lipídico, expressão de PPAR $\gamma$ , síntese de citocinas e adipocinas. Exossomos e Microvesículas também são sugeridos induzir alterações no metabolismo lipídico e síntese de citocinas de macrófagos infectados, no entanto, estudos posteriores ajudarão a se elucidar efeitos, além daqueles sobre a síntese de adipocinas e expressão de PPAR $\gamma$ .

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARI, ARUNKUMAR E., AND SUSHIL K. JAIN. 2017. "Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6).

AKAO, Y., IIO, A., ITOH, T., et al. 2011. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther.* v. 19, n. 2, p. 395-9.

AKBAR, NAVEED, VALERIO AZZIMATO, ROBIN P. CHOUDHURY, AND MYRIAM AOJADI. 2019. "Extracellular Vesicles in Metabolic Disease." *Diabetologia* 62 (12): 2179–87.

ALBUQUERQUE PC, NAKAYASU ES, RODRIGUES ML, FRASES S, CASADEVALL A, ZANCOPE-OLIVEIRA RM, ALMEIDA IC, NOSANCHUK JD. 2008. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol.* v. 10, n. 8, p. 1695-710.

ALIPOOR, S. D.; MORTAZ, E.; TABARSI, P.; FARNIA, P.; MIRSAEIDI, M.; GARSSEN, J.; MOVASSAGHI, M.; ADCOCK, I. M. 2017. Bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) infection induces exosomal miRNA release by human macrophages. *J Transl Med.* v. 15, n. 1, p.105

ALMEIDA, P. E.; ROQUE, R. R.; MAGALHÃES, K. G.; MATTOS, K. A.; TEIXEIRA, L.; MONTEIRO, C. M.; ALMEIDA, C. J. NETO, C. F.; RYFFEL, B.; QUEANIAUX, V. F. J.; BOZZA, P. T. 2014. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochimica et Biophysica Acta.*

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TOROCHSIK, D.; D'AVILA, H.; DEZSO, B.; MAGALHAES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L.; BOZZA, P. T. 2009. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *Journal of Immunology*, v. 183, p. 1337-1345

ALMEIDA, P. E.; CARNEIRO, A. C.; SILVA, A. R.; BOZZA, P. T. 2012. PPAR $\gamma$ . Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Research*, v. 2012, p. 01-07.

ALVARADO V. P. A; BERNAL, L.; PAIGE, C. A.; GROSICK, R. L.; MORACHO V. C, FERREIRA, D. W.; ULECIA, M. C.; ROMERO, S. E. A. 2017. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology.* v. 17 p. 2985 - 30093-1.

ANDALOUSSI, SAMIR EL, IMRE MÄGER, XANDRA O. Breakefield, and Matthew J.A. Wood. 2013. "Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities." *Nature Reviews Drug Discovery* 12 (5): 347–57.

<https://doi.org/10.1038/nrd3978>.

AOKI, N.; JIN-NO, S.; NAKAGAWA, Y.; ASAI, N.; ARAKAWA, E.; TAMURA, N.; TAMURA, T.; MATSUDA, T. 2007. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globuleepidermal growth factor 8-associated microvesicles, *Endocrinology* v.148, p. 3850–3862.

AOKI, N.; YOKOYAMA, R.; ASAI, N.; OHKI, M.; OHKI, Y.; KUSUBATA, K.; HEISSIG, B.; HATTORI, K.; NAKAGAWA, Y.; MATSUDA, T. 2010. Adipocyte-derived microvesicles are associated with multiple angiogenic factors and induce angiogenesis in vivo and in vitro, *Endocrinology* v. 151, p. 2567–2576.

ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R. 2017. Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease. *Nutrients*. v. 9, n. 4, p. 385

ARRESE, E. L.; SAUDALE, F. Z.; SOULAGES, J. L. Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions. *Lipid Insights*. v. 7, p. 7–16

BAEK R, SØNDERGAARD EKL, VARMING K, et al. 2016. The impact of various preanalytical treatments on the phenotype of small extracellular vesicles in blood analyzed by protein microarray. *J Immunol Meth*. v.438, p. 11–20.

ATHMAN JJ, WANG Y, MCDONALD DJ, BOOM WH, HARDING CV, WEARSCH PA. 2015. Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages. *J Immunol*. v. 195, p. 1044-1053

BALAJ, L.; LESSARD, R.; DAI, L.; CHO, Y.-J.; POMEROY, S.L.; BREAKFIELD, X.O.; SKOG, J. 2011. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat. Commun*. v. 2.

BANDEIRA-MELO C, PHOOFOLO M, WELLER PF. 2001. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem*. 276(25):22779-87

BARTZ, R., ZEHMER, J.K., ZHU, M., CHEN, Y., SERRERO, G., ZHAO, Y., LIU, P., 2007. Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res*. v. 6, p. 3256–3265.

BASSAGANYA-RIERA, J.; MISYAK, S.; GURI, A. J.; HONTECILLAS, R. 2009. PPAR  $\gamma$  is highly expressed in F4/80 adipose tissue macrophages and dampens adipose-tissue inflammation. *Cellular Immunology*. v. 258, n. 2, p. 138-146.

BAUER, KAYLYN M., JUNE L. ROUND, AND RYAN M. O'CONNELL. 2021. *No Small Matter:Emerging Roles for Exosomal MiRNAs in the Immune System*. *FEBS Journal*.

BECKER, ANNETTE, BASANT KUMAR THAKUR, JOSHUA MITCHELL WEISS, HAN SANG KIM, HÉCTOR PEINADO, AND DAVID LYDEN. 2016. “Extracellular

Vesicles in Cancer: Cell-to Cell Mediators of Metastasis.” *Cancer Cell* 30 (6): 836–48.

BERNER, HEIDI S., STAALE P. LYNSTADAAS, AXEL SPAHR, MARTA MONJO, LIV THOMMESEN, CHRISTIAN A. DREVON, UNNI SYVERSEN, AND JANNE E RESELAND. 2004. “Adiponectin and Its Receptors Are Expressed in Bone-Forming Cells.” *Bone* 35 (4): 842–49.

BEIL WJ, WELLER PF, PEPPERCORN MA, GALLI SJ, DVORAK AM. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 1995;58(3):284-98

BELKAID, YASMINE, AND TIMOTHY W. HAND. 2014. “Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation.” *Cell* 157 (1): 121–41.

BELLER, M, THIEL, K, THUL, PJ, JACKLE, H. 2010. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* v. 584, p. 2176–2182.

BENINSON LA, FLESHNER M. 2015. Exosomes in fetal bovine serum dampen primary macrophage IL-1 $\beta$  response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Immunol Lett.* v.163, n. 2, p. 187–192.

BERG AH, SCHERER PE. 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96:939–49

BHATNAGAR S, SHINAGAWA K, CASTELLINO FJ, SCHOREY JS. 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* v. 110, p. 3234-3244

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. 2009. PAT proteins, na ancient Family of lipid droplets proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v. 6, p. 419-440

BLANCHARD, N.; LANKAR, D.; FAURE, F.; REGNAULT, A.; DUMONT C.; RAPOSO, G.; HIVROZ, C. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex, *J. Immunol.* v. 168, p. 3235–3241.

BLASZCZAK, ALECIA M., ANAHITA JALILVAND, AND WILLA A. HSUEH. 2021. “Adipocytes, Innate Immunity and Obesity: A Mini-Review.” *Frontiers in Immunology* 12 (June): 1–7.

BOUCHAREYCHAS, LAURA, PHAT DUONG, SERGIO COVARRUBIAS, ERIC ALSOP, TUAN ANH PHU, ALLEN CHUNG, MICHAEL GOMES, et al. 2020. “Macrophage Exosomes Resolve Atherosclerosis by Regulating Hematopoiesis and Inflammation via MicroRNA Cargo.” *Cell Reports* 32 (2): 107881.

BOULANT, S., MONTSERRET, R., HOPE, R.G., RATINIER, M., TARGETT-ADAMS, P., LAVERGNE, J.-P., PENIN, F., MCLAUCHLAN, J. 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* v. 281, p. 22236–22247.

BOUTENS, L., AND STIENSTRA, R. 2016. Adipose tissue macrophages: going off

track during obesity. *Diabetologia* v. 59, p. 879-894.

BOZZA PT, BANDEIRA-MELO C. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2; v. 100(Suppl 1), p. 113-120

BOZZA, P. T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R, A.; BANDEIRA-MELO, C. 2011. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. v. 85, n. 5, p. 205-213

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. 2009. Leukocyte lipid bodies – Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, p.540-551

BOZZA, P. T.; YU, W.; WELLER, P. F. 1997. Mechanisms of Formation and Function of Eosinophil Lipid Bodies: Inducible Intracellular Sites Involved in Arachidonic Acid Metabolism. v. 92, n. ii, p.135-140

BOZZA, PT, MELO, RCN, BANDEIRA-MELO, C. 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* v. 113, p. 30–49.

BRAISSANT O, FOUFELLE F, SCOTTO C, DAUÇA M, WAHLI W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology*. v.137, n. 1, p. 354–366.

BRASAEMLE, D.L., 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* v. 48, p. 2547–2559.

BRASAEMLE, D.L., BARBER, T., WOLINS, N.E., SERRERO, G., BLANCHETTE-MACKIE, E.J., LONDOS, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* v. 38, p. 2249– 2263.

BRASAEMLE, DL, DOLIOS, G, SHAPIRO, L, WANG, R. 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* v. 279, p. 46835–46842.

BROWN G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. v. 1504, n. 1, p. 46–57

BUSSELL, R., ELIEZER, D., 2003. A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* v. 329, p. 763–778.

CAI D, YUAN M, FRANTZ DF, MELENDEZ PA, HANSEN L, ET AL. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat. Med.* v.11, p. 183–90

- CAMINO, TAMARA, NEREA LAGO-BAAMEIRO, AURELIO MARTIS-SUEIRO, IVÁN COUTO, FRANCISCO SANTOS, JAVIER BALTAR, AND MARÍA PARDO. 2020. "Deciphering Adipose Tissue Extracellular Vesicles Protein Cargo and Its Role in Obesity." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 1–16.
- CAMINOS, J. EDUARDO, RUBÉN NOGUEIRAS, ROSALÍA GALLEGO, SUSANA BRAVO, SULAY TOVAR, TOMÁS GARCÍA-CABALLERO, FELIPE F. CASANUEVA, AND CARLOSDIÉGUEZ. 2005. "Expression and Regulation of Adiponectin and Receptor in Human and Rat Placenta." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (7): 4276–86.
- CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M.; BURCELIN, R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, v. 57, p.1470- 1481.
- CARDONA PJ, LLATJOS R, GORDILLO S, DIAZ J, OJANGUREN I, ARIZA A, e cols. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* v. 52, n. 2, p. 156-63.
- CARUSO, G.; FRESTA, C. G.; MARTINEZ-BECERRA, F.; ANTONIO, L.; JOHNSON, R. T.; CAMPOS, R. P. S.; SIEGEL, J. M.; WIJESINGHE, M. B.; LAZZARINO, G.; LUNTE, S. M. 2017. Carnosine modulates nitric oxide in stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry.* v. 431, p. 197–210
- CHAPMAN, KENT D, MINA AZIZ, JOHN M DYER, AND ROBERT T MULLEN. 2019. "Mechanisms of Lipid Droplet Biogenesis," 1929–42.
- CHARO, I. F. 2007. Macrophage Polarization and Insulin Resistance: PPAR $\gamma$  in Control. v. 6, n. 2, p. 96-98
- CHAWLA, A.; SCHWARZ, E. J.; DIMACULANGAN, D. D.; LAZAR, M. A. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, v. 135, n. 2, p. 798–800.
- CHEN,K., LI,J., WANG,J., XIA,Y., DAI,W., WANG,F., SHEN,M., CHENG,P., ZHANG,Y., WANG,C., YANG,J.,ZHU,R.,ZHANG,H., ZHENG,Y.,LU,J., FAN,Z., ZHOU,Y., GUO,C., 2014.15-Deoxy-gamma12,14 prostaglandin J2 reduces liver impairment in a model of ConA-induced acute hepatic inflammation by activation of PPAR- gamma and reduction in NF-kappaB activity. *PPARRes.* v. 215631
- CHOUDHARY, VINEET, AND ROGER SCHNEITER. 2021. "A Unique Junctional Interface at Contact Sites Between the Endoplasmic Reticulum and Lipid Droplets." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (April): 1–13.
- CINTI S, MITCHELL G, BARBATELLI G, MURANO I, CERESI E, FALOIA E, WANG S, FORTIER M, GREENBERG AS, OBIN MS. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* v. 6, n. 11, p. 2347-55.

CINTI, S; MITCHELL G, BARBATELLI G, MURANO I, CERESI E, FALOIA E, ET AL. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 2347–2355

CLEMENT, EMILY, IKRAME LAZAR, CAMILLE ATTANÉ, LORRY CARRIÉ, STÉPHANIE DAUVILLIER, MANUELLE DUCOUX-PETIT, DAVID ESTEVE, et al. 2020. “Adipocyte Extracellular Vesicles Carry Enzymes and Fatty Acids That Stimulate Mitochondrial Metabolism and Remodeling in Tumor Cells.” *The EMBO Journal* 39 (3): 1–20.

COCUCCI E, MELDOLESI J. 2015. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* v. 25, n.6, p. 364–372.

COSSETTI, C.; IRACI, N.; MERCER, T.R.; LEONARDI, T.; ALPI, E.; DRAGO, D.; ALFARO-CERVELLO, C.; SAINI, H.K.; DAVIS, M.P.; SCHAEFFER. 2014. J. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- via *lfngr1* to activate *Stat1* signaling in target cells. *Mol. Cell* v. 56, p. 193–204.

COTTIER S, SCHNEITER R. 2022. Lipid droplets form a network interconnected by the endoplasmic reticulum through which their proteins equilibrate. *J Cell Sci.* 135(5).

CRUZ, A. L. S.; BARRETO, E. A.; FAZOLINI, N. P. B.; VIOLA, J. P. B.; BOZZA, P. T. 2020. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death & Disease.* v. 11, n. 105.

D'AVILA, H, MELO, RCN, PARREIRA, GG, WERNECK-BARROSO, E, CASTRO-FARIA-NETO, HC, BOZZA, PT. 2006. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* v. 176, p. 3087–3097

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJAFIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C. N.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. 2011. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E<sub>2</sub> Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 6, p. 951–961

D'AVILA, H; MAYA-MONTEIRO, C.M; BOZZA, P.T. 2008. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International immunopharmacology*, v. 8, p. 1308-1315.

D'AVILA, H; SOUZA, N. P.; ALBERTONI, A. L. S. CAMPOS, C. C.; RAMPINELLI, P. G.; CORRÊA, J. R.; ALMEIDA, P. E.. 2021. “Impact of the Extracellular Vesicles Derived From *Trypanosoma Cruzi* : A Paradox in Host Response and Lipid Metabolism Modulation.” *Front. Cell. Infect. Microbiol* 11 (October): 1–9.

DE ASSIS, EF, SILVA, AR, CAIADO, LF, MARATHE, GK, ZIMMERMAN, GA, PRESCOTT, SM, MCINTYRE, TM, BOZZA, PT, DE CASTRO-FARIA-NETO, HC. 2003. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low

density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol.* v. 171, p. 2090–2098.

DE FRONZO, R. A. 2001. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* (143):9-21. *Endocrinol Metab.* v. 86, n. 5, p. 1930-5.

DELAIGLE, AURÉLIE M., JEAN CHRISTOPHE JONAS, ISABELLE B. BAUCHE, OLIVIER CORNU, AND SONIA M. BRICHARD. 2004. "Induction of Adiponectin in Skeletal Muscle by Inflammatory Cytokines: In Vivo and in Vitro Studies." *Endocrinology* 145 (12): 5589–97.

DENG, TUO, JOEY LIU, YANRU DENG, LAURIE MINZE, XIANG XIAO, VALERIE WRIGHT, RICHENG YU, ET AL. 2017. "Adipocyte Adaptive Immunity Mediates Diet-Induced Adipose Inflammation and Insulin Resistance by Decreasing Adipose Treg Cells." *Nature Communications* 8: 1–11.

DENG, TUO, CHRISTOPHER J. LYON, LAURIE J. MINZE, JIANXIN LIN, JIA ZOU, JOEY Z. LIU, YUELAN REN, ET AL. 2013. "Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation." *Cell Metabolism* 17 (3): 411–22.

DESREUMAUX, P., L. DUBUQUOY, S. NUTTEN, M. PEUCHMAUR, W. ENGLARO, K. SCHOONJANS, B. DERIJARD, B. DESVERGNE, W. WAHLI, P. CHAMBON, et al. 2001. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) heterodimer: a basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* v. 193, p. 827–838

DE SOUZA CT, ARAUJO EP, BORDIN S, ASHIMINE R, ZOLLNER RL, et al. 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* v.146, p. 4192–99

DESVERGNE B, WAHLI W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews.* v.20, n. 5, p. 649–688.

DIAZ , G.; WOLFE , L. M.; KRUIH-GARCIA, N. A.; DOBOS, K. M. 2016. Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection. *SCI. REP.* v. 29, n. 6, p. 37975

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

DVORAK, A. M.; MORGAN, E.; SCHLEIMER, R. P. 1992. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 40, n. 6, p. 759-76

EDVARDSSON, U.; LJUNGBERG, A.; LINDÉN, D.; WILLIAM-OLSSON, L.; PEILÖT-SJÖGREN, H.; AHNMARKAND, A.; OSCARSSON, J. 2006. PPAR $\alpha$  activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *The Journal of Lipid Research.* v. 47, p. 329-340



EGUCHI, A., MULYA, A., LAZIC, M., et al. 2015. Microparticles release by adipocytes act as "find-me" signals to promote macrophage migration. *PLoS One* v.10, e0123110

EHSES, J.A. , PERREN A, EPPLER E, RIBAUX P, POSPISILIK JA, et al. 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* v.56, p. 2356–70

ENGIN, A. B. 2017. ADIPOCYTE-MACROPHAGE CROSS-TALK IN OBESITY. *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, 327–343

EVAN D. ROSEN, CHUNG-HSIN HSU, XINZHONG WANG, SHUICHI SAKAI, MASON W. FREEMAN, FRANK J. GONZALEZ, AND BRUCE M. SPIEGELMAN. 2002. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes Dev.* v. 16, n. 1, p. 22–26.

GAO, XUAN, CARLOS SALOMON, AND DILYS J. FREEMAN. 2017. "Extracellular Vesicles from Adipose Tissue-A Potential Role in Obesity and Type 2 Diabetes?" *Frontiers in Endocrinology* 8 (AUG).

GIRI PK, KRUIH NA, DOBOS KM, SCHOREY JS. 2010. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics.* v. 10, p. 3190-3202

HAMAGUCHI, MASAhide, AND SHIMON SAKAGUCHI. 2012. "Regulatory T Cells Expressing PPAR- $\gamma$  Control Inflammation in Obesity." *Cell Metabolism* 16 (1): 4–6.

HILL, ANDREW F. 2019. "Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases." *Journal of Neuroscience* 39 (47): 9269–73.

FAJAS L, AUBOEUF D, RASPE E, SCHOONJANS K, LEFEBVRE AM, SALADIN R, et al. 2000. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 275, p. 1873–1877.

FAJAS L, DEBRIL MB, AUWERX J. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ : from adipogenesis to carcinogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology.* v. 27, n. 1, p. 1–9.

FAJAS L, FRUCHART JC, AUWERX J. 1998. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters.* v.438, n. 1-2, p. 55–60.

FARESE, RV, WALTHER, TC. 2009. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* v. 139, p. 855–860.

FEIGE JN, GELMAN L, MICHALIK L, DESVERGNE B, WAHLI W. 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in Lipid Research.* v. 45, n. 2, p. 20–159.

FEUERER M, HERRERO L, CIPOLLETTA D, NAAZ A, WONG J, et al. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* v. 15, p. 930–39

FJELDBORG, KAREN, STEEN B. PEDERSEN, HOLGER J. MØLLER, TORE CHRISTIANSEN, MARIANNE BENNETZEN, AND BJØRN RICHELSEN. 2014. "Human Adipose Tissue Macrophages Are Enhanced but Changed to an Anti-Inflammatory Profile in Obesity." *Journal of Immunology Research* 2014.

FLAHERTY, STEPHEN E, AMBAR GRIJALVA, XIAOYUAN XU, ELEANORE ABLES, ALIREZA NOMANI, AND ANTHONY FERRANTE JR. 2019. "A Lipase Independent Pathway of Lipid Release and Immune Modulation by Adipocytes." *Science* 363 (6430): 989–993.

FLYNN JL, CHAN J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* v, 19, p. 93-129.

FRIELER, RYAN A., SAIPRASAD RAMNARAYANAN, AND RICHARD M. MORTENSEN. 2012. "Nuclear Receptor Control of Opposing Macrophage Phenotypes in Cardiovascular Disease." *Frontiers in Bioscience* 17 (5): 1917–30.

FUJIMOTO T, KOGO H, ISHIGURO K, TAUCHI K, NOMURA R. 2001. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* v. 152, n. 5, p. 1079-85.

FUJIMOTO Y, ITABE H, SAKAI J, MAKITA M, NODA J, MORI M, E COLS. 2004. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys* 1644(1):47-59.

GAO X. P., STANDIFORD T. J., RAHMAN A., et al. 2002. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> and gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> mice. *Journal of Immunology.* v. 168, n. 8, p. 3974–3982.

GANGODA, L.; BOUKOURIS, S.; LIEM, M.; KALRA, H.; MATHIVANAN, S. 2015. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? *Proteomics.* v. 15, p. 260–271.

GARCÍA-MARTÍNEZ, M.; VÁZQUEZ-FLORES, L.; ÁLVAREZ-JIMÉNEZ, V. D.; CASTAÑEDA-CASIMIRO, J.; IBÁÑEZ-HERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; BARRIOS-PAYÁN, J.; MATA-ESPINOSA, D.; ESTRADA-PARRA, S.; CHACÓN-SALINAS, R.; SERAFÍN-LÓPEZ, J.; WONG-BAEZA, I.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; ESTRADA-GARCÍA. 2019. Extracellular vesicles released by J774A.1 macrophages reduce the bacterial load in macrophages and in an experimental mouse model of tuberculosis. v. 14, p. 6707–6719

GIL-BONA A, MONTEOLIVA L, GIL C. 2015. Global Proteomic Profiling of the Secretome of *Candida albicans* ecm33 Cell Wall Mutant Reveals the Involvement of Ecm33 in Sap2 Secretion. *J Proteome Res.* v. 14, n. 10, p. 4270-81.

GIRI PK, SCHOREY JS. 2008. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigenspecific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. v. 3: e2461

GIRI PK, KRUIH NA, DOBOS KM, SCHOREY JS. 2010. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics*. v. 10, p. 3190-3202

GONÇALVES, M. F., UMEZAWA, E. S., KATZIN, A. M., DE SOUZA, W., ALVES, M. J. M., ZINGALES, B., ET AL. (1991). Trypanosoma Cruzi: Shedding of Surface Antigens as Membrane Vesicles. *Exp. Parasitol.* 72 (1), 43–535.

GREENBERG, ANDREW, S.; ROSALIND, A. C.; FREDRIC, B. K.; JAMES, L. M.; MARTIN S. O.; VISHWAJEET, P.; QING, W. Y.; HIDEAKI, M.; DOUGLAS, G. M. 2011. "The Role of Lipid Droplets in Metabolic Disease in Rodents and Humans." *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 6, p. 2102–10

GREGOR, M. F; HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Inflammatory Mechanisms in Obesity, *Annu. Rev. Immunol*, v. 29, p. 415–445.

GRILLITSCH, K., CONNERTH, M., KÖFELER, H., ARREY, T.N., RIETSCHEL, B., WAGNER, B., KARAS M., DAUM, G., 2011. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets Proteome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* v. 1811, p. 1165–1175.

GUAN, CHENGCHENG, YANGE NIU, SI CONG CHEN, YUNLU KANG, JING XIANG WU, KOJI NISHI, CATHERINE C.Y. CHANG, TA YUAN CHANG, TUOPING LUO, AND LEI CHEN. 2020. "Structural Insights into the Inhibition Mechanism of Human Sterol O-Acyltransferase 1 by a Competitive Inhibitor." *Nature Communications* 11 (1): 1–11.

GUAN Y, BREYER MD. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney International*. v.60, n. 1, p. 14–30.

GUILHERME; ADILSON; JOSEPH, V. V.; PURI, V.; MICHAEL, P. C. 2008. "Adipocyte Dysfunctions Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Nature Reviews Molecular*, v. 9 n. 5, p. 367–77,

HAASE, J., WEYER, U., IMMIG, K., et al. 2014. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia* v. 57, p. 562-571.

HAOXI WU, PEDRO CARVALHO, GIA K. VOELTZ. 2018. "Here, There and Everywhere: The Importance of ER Membrane Contact Sites." *Science* 361 (6401): 1–27.

HE W, BARAK Y, HEVENER A, et al. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.100, n. 26, p. 15712–15717.

HEIKKINEN, S.; AUWERX, J.; ARGMANN, C. A. 2007. PPAR $\gamma$  in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*. v. 1771, n. 8, p. 999–1013.

HODGES, B. D. M. AND WU, C. C. 2010. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *The Journal of Lipid Research*, v. 51, p. 262-273.

HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM. 1995. Increased adipose tissue expression. of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* v. 95, p. 2409–15

HOTAMISLIGIL; GOKHAN, S. 2006. “Inflammation and Metabolic Disorders.” *Nature*, v. 444 n. 7121, p. 860–67

INAFUKU, M.; MATSUZAKI, G.; OKU, H. 2015. Intravenous Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guérin Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese, Diabetic ob/ob Mice. *Plos One*. v. 10, n. 6. 0128676.

INAZAWA, Y. ; MASAMI NAKATSU, ETSUKO YASUGI, KUMIKO SAEKI, AKIRA YUO. 2003. Lipid Droplet Formation in Human Myeloid NB4 Cells Stimulated by All Trans Retinoic Acid and Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Possible Involvement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ . *Cell Structure and Function*

ISMAIL, N., WANG, Y., DAKHLALLAH, D., et al. 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* v. 121, p. 984-995.

ITO A, SUGANAMI T, YAMAUCHI A, DEGAWA-YAMAUCHI M, TANAKA M, et al. 2008. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J. Biol. Chem.* v. 283, p. 35715–23

JAYABALAN, NANTHINI, SOUMYALEKSHMI NAIR, ZARIN NUZHAT, GREGORY E. RICE, FELIPE A. ZUÑIGA, LUIS SOBREVIA, ANDREA LEIVA, et al. 2017. “Cross Talk between Adipose Tissue and Placenta in Obese and Gestational Diabetes Mellitus Pregnancies via Exosomes.” *Frontiers in Endocrinology* 8 (SEP).

JÉQUIER, E. 2002. Pathways to obesity. *International Journal of Obesity*. v. 26, p. S12–S17.

JÉQUIER, E. 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. v. 967, p. 379-88.

JIANG C, TING AT, SEED B. 1998. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. v.391, n. 6662, p. 82–86.

JING PU, CHEOL WOONG HA, SHUYAN ZHANG, JONG PIL JUNG, WON-KI HUH & PINGSHENG LIU. 2011. Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein & Cell*. v. 2, p. 487–496

JONG-MIN LEE, SUNG SOO KIM, YOUNG-SEOK CHO. 2012. The Role of PPAR $\gamma$  in Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinogenesis. *PPAR Research*. v. 2012

JURKOSHEK KS, WANG Y, ATHMAN JJ, BARTON MR, WEARSCH PA. 2016.

Interspecies Communication between Pathogens and Immune Cells via Bacterial Membrane Vesicles. *Front Cell Dev Biol.* v. 4, p. 125

KALRA, H.; DRUMMEN, G. P. C.; MATHIVANAN, S. 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* v. 17, p. 170;

KAMEI N, TOBE K, SUZUKI R, OHSUGI M, WATANABE T, et al. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* v. 281, p. 26602–14

KANDA H, TATEYA S, TAMORI Y, KOTANIK, HIASAK, et al. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Investig.* v. 116, p. 1494–505

KANNEGANTI, THIRUMALA DEVI, AND VISHWA DEEP DIXIT. 2012. “Immunological Complications of Obesity.” *Nature Immunology* 13 (8): 707–12. <https://doi.org/10.1038/ni.2343>.

KESHTKAR, SOMAYEH, NEGAR AZARPIRA, AND MOHAMMAD HOSSEIN GHAREMANI. 2018. “Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Novel Frontiers in Regenerative Medicine.” *Stem Cell Research and Therapy* 9 (1): 1–9.

KIM, AHLEE, AMY SHAH, AND TAKAHISA NAKAMURA. 2018. “Extracellular Vesicles: A Potential Novel Regulator of Obesity and Its Associated Complications.” *Children* 5 (11): 152.

KIM J.A.; MONTAGNANI, M.; KOH, K. K.; QUON, M. J. 2006. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, v. 113, p. 1888-1904.

KIM JS, RYU MJ, BYUN EH, KIM WS, WHANG J, MIN KN, SHONG M, KIM HJ, SHIN SJ. 2011. Differential immune response of adipocytes to virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* v. 13, n. 14-15, p. 1242-51.

KNOUFF C, AUWERX J. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr. Rev.* v.25, p. 899–918.

KOERNER, A.; KRATZSCH, J.; KIESS, W. 2005. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 19, p. 525–546.

KONOSHENKO, M. Y.; LEKCHNOV, E. A.; VLASSOV, A. V.; LAKTIONOV, P. P. 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International.* v. 2018, 27 pages.

KOUTNIKOVA H<sup>1</sup>, COCK TA, WATANABE M, HOUTEN SM, CHAMPY MF, DIERICH A, AUWERX J. 2003. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 100, n. 24. p.14457-62.

KOWAL, J., G. ARRAS, M. COLOMBO, M. JOUVE, J. P. MORATH, B. PRIMDAL-BENGTSON, F. DINGLI, D. LOEW, M. TKACH, AND C. THERY. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. **113**, p. 968-977.

KRAUSGRUBER T<sup>1</sup>, BLAZEK K, SMALLIE T, ALZABIN S, LOCKSTONE H, SAHGAL N, HUSSELL T, FELDMANN M, UDALOVA IA. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol.* v. 12, n. 3, p. 231-8.

KUBOTA T, KUBOTA N, KADOWAKI T. 2017. Imbalanced Insulin Actions in Obesity and Type 2 Diabetes: Key Mouse Models of Insulin Signaling Pathway. *Cell Metab.* v. 25, n. 4, p. 797-810.

KUBOTA, K.; MORIYAMA, M.; FURUKAWA, S.; RAFIUL, H.; MARUSE, Y.; JINNO, T.; TANAKA, A.; OHTA, M.; ISHIGURO, N.; YAMAUCHI, M.; SAKAMOTO, M.; MAEHARA, T.; HAYASHIDA, J. N.; KAWANO, S.; KIYOSHIMA, T.; NAKAMURA, S. 2017. CD163+CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 1755.

KUERSCHNER L, MOESSINGER C, THIELE C. 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* v. 9, n. 3, p. 338-52

KURODA, MASASHI, AND HIROSHI SAKAUE. 2017. "Cause of Adipocyte Death" 64 (8): 193–96.

LOVO-MARTINS, MARIA ISABEL, APARECIDA DONIZETTE MALVEZI, NÁGELA GHABDAN ZANLUQUI, BRUNO FERNANDO CRUZ LUCCHETTI, VERA LÚCIA HIDEKO TATAKIHARA, PATRICIA ALVES MÖRKING, ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA, SAMUEL GOLDENBERG, PRYSCILLA FANINI WOWK, AND PHILENO PINGE-FILHO. 2018. "Extracellular Vesicles Shed By Trypanosoma Cruzi Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages." *Frontiers in Immunology* 9 (APR).

LAFONTAN, M. 2005. FAT CELLS: Afferent and Efferent Messages Define New Approaches to Treat Obesity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* v. 45, p. 119-146

LAUTERBACH, M. A. R.; WUNDERLICH, F. T. 2017. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* v. 469, p. 385–396.

LEE BC, LEE J. 2014. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* v. 1842, n. 3, p. 446-62.

LEE J, KIM SH, CHOI DS, LEE JS, KIM DK, GO G, PARK SM, SHIN JH, CHANG CL, GHO YS. 2015. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics.* v. 15, p. 3331-3337

LEHRKE M, LAZAR MA. 2005. The many faces of PPARgamma. *Cell*. v. 123, p. 993–9. CAO, L.; XU, H.; WANG, GE.; LIU, M.; TIAN, D; ZHENGLINYUAN, Y. 2019. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells attenuate dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis by promoting M2 macrophage polarization. *International Immunopharmacology*. v. 72, p. 264-274

LI J, LEE Y, JOHANSSON HJ, et al. 2015. Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. v.4, n. 1, p. 26883.

LI, P.; KASLAN, M.; LEE, S. H.; YAO, J.; GAO, Z. 2017. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. v. 7, n. 3, p. 789-804

LIN, JIN, JING LI, BO HUANG, JING LIU, XIN CHEN, XI MIN CHEN, YAN MEI XU, LIN FENG HUANG, AND XIAO ZHONG WANG. 2015. “Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis.” *Scientific World Journal* 2015.

LIU J, DIVOUX A, SUN J, ZHANG J, CLEMENT K, et al. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med*. v. 15, p. 940–45

LIU, M.; WANG, Z.; REN, S.; ZHAO, H. 2021. Exosomes derived from mycobacterium tuberculosis-infected MSCs induce a pro-inflammatory response of macrophages. *13(8):11595-11609*. v. 13, n. 8, p; 11595-11609.

LONGO, M.; ZATTERALE, F.; NADERI, J.; PARRILLO, L.; FORMISANO, P.; RACITI, G. A.; BEGUINOT, F.; MIELE, C. 2019. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. v. 20; n. 9, p. 2358.

LŐRINCZ ÁM, TIMÁR CI, MAROSVÁRI KA, et al. 2014. Effect of storage on physical and functional properties of extracelular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. *J Extracell Vesicles*. v. 3, n. 1, p. 25465

LOTVALL J, HILL AF, HOCHBERG F, et al. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracelular vesicles and their functions: a position statement from the international society for extracelular vesicles. *J Extracell Vesicles*. v. 3, p. 26913.

LUMENG CN<sup>1</sup>, BODZIN JL, SALTIEL AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. v. 117, n. 1, p. 175-84.

LUMENG, C.N., DELPROPOSTO, J.B., WESTCOTT, D.J., et al. 2008. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* v. 57, p. 3239-3246.

MACK, M.; KLEINSCHMIDT, A.; BRUHL, H.; KLIER, C.; NELSON, P. J.; CIH. AK, J.; PLACHY, J.; STANGASSINGER, M.; ERFLE, V.; SCHLONDORFF, D. 2000. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection, *Nat. Med*. v. 6, p. 769–775.

MAHAJAN, S.; BHASKAR, N.; KAUR, H.; PANDEY, R.; MANHAS, S. 2015. Lipid Droplets: a Dynamic Organelle in Health and Disease. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 173 – 184

MANTEL, P. Y., AND MARTI, M. (2014). The Role of Extracellular Vesicles in Plasmodium and Other Protozoan Parasites. *Cell. Microbiol.* 16 (3), 344–545

MANTZARLIS, K.; TSOLAKI, V.; ZAKYNTHINOS, E. 2017. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev.* v. 2017

MARIËTTE, E.G.; KRANENDONK; FRANK, L.J. VISSEREN; BAS, W.M.; VAN, BALKOM; ESTHER, N.M.; NOLTE-T HOEN; JOOST, A.; VAN, HERWAARDEN; WILCO DE JAGER; HENK S. SCHIPPER; ARJAN B. BRENKMAN; MARIANNE C. VERHAAR; MARCA H.M. WAUBEN; ERIC KALKHOVEN. 2013. Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity, a research journal.* v. 22, n. 5, p. 1296-1308.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. 2015. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *European Journal of Pharmacology.*

MAROTO R, ZHAO Y, JAMALUDDIN M, et al. 2017. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles.* v. 6, n. 1, p. 1359478.

MARTIN, S. AND PARTON, R. G. 2006. Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 5, p. 373-8, 2006.

MATHIEU, MATHILDE, LORENA MARTIN-JAULAR, GRÉGORIE LAVIEU, AND CLOTILDE THÉRY. 2019. “Specificities of Secretion and Uptake of Exosomes and Other Extracellular Vesicles for Cell-to-Cell Communication.” *Nature Cell Biology* 21(1): 9–17.

MATTOS KA<sup>1</sup>, D'AVILA H, RODRIGUES LS, OLIVEIRA VG, SARNO EN, ATELLA GC, PEREIRA GM, BOZZA PT, PESSOLANI MC. 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* v. 87, n. 3, p. 371-84;

MATTOS KA<sup>1</sup>, SARNO EN, PESSOLANI MC, BOZZA PT. 2012. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 107 p. 156-66

MATSUZAWA, Y. 2005. White adipose tissue and cardiovascular disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 19, p. 637–647.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. G.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; PINHEIRO, R. O.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C.; BOZZA, P. T. 2011. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.* v. 187, n. 5, p. 2548-58.



MAURY, E.; BRICHARD, S. M. 2010. "Adipokine Dysregulation, Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome." *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 314, n. 1, p. 1–16.

MAZINI, LOUBNA, LUC ROCHETTE, BRAHIM ADMOU, SAID AMAL, AND GABRIEL MALKA. 2020. "Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing." *International Journal of Molecular Sciences*. v. 21, n. 4.

MAZINI, LOUBNA, LUC ROCHETTE, MOHAMED AMINE, AND GABRIEL MALKA. 2019. "Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs)." *International Journal of Molecular Sciences*. v. 20, n. 10, p. 1–30.

MAZINI, LOUBNA, LUC ROCHETTE, AND GABRIEL MALKA. 2021. "Exosomes Contribution in COVID-19 Patients' Treatment." *Journal of Translational Medicine* 19 v. 1, p. 1–8.

MEARS, R.; CRAVEN, R. A.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; UPTON, C.; YOUNG, S. L.; PATEL, P.; SELBY, P. J.; BANKS, R. E. 2004. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by twodimensionalpolyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics* v. 4, p. 4019–4031.

MELO, R. C. N. et al. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue cell*, v. 35, n. 1, p. 59-67

MERINO-GONZÁLEZ, CONSUELO, FELIPE A. ZUÑIGA, CARLOS ESCUDERO, VALESKA ORMAZABAL, CAMILA REYES, ESTEFANÍA NOVA-LAMPERTI, CARLOS SALOMÓN, AND CLAUDIO AGUAYO. 2016. "Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application." *Frontiers in Physiology* 7 (FEB): 1–9.

MIRZA, AGHA ZEESHAN, ISMAIL I. ALTHAGAFI, AND HINA SHAMSHAD. 2019. "Role of PPAR Receptor in Different Diseases and Their Ligands: Physiological Importance and Clinical Implications." *European Journal of Medicinal Chemistry* 166: 502–13.

MOMEN-HERAVI, FATEMEH. 2017. "Chapter 3" 1660: 25–32.

MONSALVE, F. A.; PYARASANI, R. D.; DELGADO-LOPEZ, F.; MOORE-CARRASCO, R. 2013. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators Inflamm*. v. 2013

MONSEL, A.; ZHU, Y.; GUDAPATI, V.; LIM, H.; LEE, W. J. 2016. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 16, n. 7

MONTEIRO L, PEREIRA JADS, PALHINHA L, MORAES-VIEIRA PMM. 2019.

Leptin in the regulation of the immunometabolism of adipose tissue-macrophages. *J Leukoc Biol.* v. 106, n. 3, p. 703-716

MORRIS, D.L., SINGER, K., AND LUMENG, C.N. 2011. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* v. 14, p. 341-346.

MOTOMURA, W.; INOUE, M.; OHTAKE, T. TAKAHASHI, N.; NAGAMINE, M. TANNO, S.; KOHGO, Y.; OKUMURA, T. 2006. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 340, n. 4, p. 1111-1118

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel 2019. Disponível em: <http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>. Acesso em 21/01/2020.

MULLER L, HONG C-S, STOLZ DB, et al. 2014. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Meth.* v.411, p. 55–65.

MURPHY DJ, VANCE J. 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci.* v. 24, n. 3, p. 109-15.

NAGY, L.; BOZZA, P.T. 2009. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *Journal of Immunology*, v. 183, p. 1337-1345.

NAKAMURA T, FURUHASHI M, LI P, CAO H, TUNCMAN G, et al. 2010. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* v.140, p. 338–48

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* v. 387, n. 10026, p. 377-1396.

NGUYEN, M.T.; FAVEL, Y. S.; NGUYEN, A. K.; REICHART, D.; SCOTT, P. A.; JENN, A. R.; GLASS, C. K.; NEELS, J. G.; OLEFSKY J. M. 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and jnk-dependent pathways. *J Biol Chem*, v. 282, p. 35279-35292.

NISHIMURA F, TANIGUCHI A, IWAMOTO Y, SOGA Y, FUKUSHIMA M, NAGASAKA S, NAKAI Y, MURAYAMA Y. 2003. Porphyromonas gingivalis Infection Is Associated With Elevated C-Reactive Protein in Nonobese Japanese Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care.* v. 25, n. 10, p. 1888.

NISHIMURA S, MANABE I, NAGASAKIM, ETO K, YAMASHITA H, et al. 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* v. 15, p. 914–20

NOGUEIRA, P. M., DE MENEZES-NETO, A., BORGES, V. M., DESCOTEAUX, A., TORRECILHAS, A. C., XANDER, P., et al. 2020. Immunomodulatory Properties of Leishmania Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF- $\kappa$ B Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 380

NOGUEIRA, P. M., RIBEIRO, K., SILVEIRA, A. C. O., CAMPOS, J. H., MARTINS-FILHO, O. A., BELA, S. R., ET AL. (2015). Vesicles From Different Trypanosoma Cruzi Strains Trigger Differential Innate and Chronic Immune Responses. *J. Extracellular Vesicles* 4 (1), 1–16.

NOREN HOOTEN, NICOLE, AND MICHELE K. EVANS. 2020. "Extracellular Vesicles as Signaling Mediators in Type 2 Diabetes Mellitus." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 318 (6): C1189–99.

NOURIAN, M.; CHALESHI, V.; PISHKAR, L.; AZIMZADEH, P.; BARADARAN, G. S.; BALALI, H.; ALINAGHI, S.; SHAHROKH, S.; ASADZADEH; AGHDAEI, H.; ZALI, M. R. 2017. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- $\alpha$  gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases. *Biomed Rep*, v. 6, n. 6, p. 698-70.

O'BRIEN, KILLIAN, KOEN BREYNE, STEFANO UGHETTO, LOUISE C. LAURENT, AND XANDRA O. BREAKFIELD. 2020. "RNA Delivery by Extracellular Vesicles in Mammalian Cells and Its Applications." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (10): 585–606.

OGAWA, S., J. LOZACH, C. BENNER, G. PASCUAL, R. K. TANGIRALA, S. WESTIN, A. HOFFMANN, S. SUBRAMANIAM, M. DAVID, M. G. ROSENFELD, AND C. K. GLASS. 2005. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Tolllike receptors. *Cell*. v. 122, p. 707–721.

OGAWA, R., TANAKA, C., SATO, M., et al. 2010. Adipocyte-derived microvesicles contain RNA that is transported into macrophages and might be secreted into blood circulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 398, p. 723-729.

OGAWA, R.; TANAKA, C.; SATO, M.; NAGASAKI, H.; SUGIMURA, K.; OKUMURA, K.; NAKAGAWA, Y.; AOKI, N. 2010. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 398, p. 723–729

OGLESBY, A. K.; SECNIK, K.; BARRON, J.; AL-ZAKWANI, I.; LAGE, M. J. 2006. The association between diabetes related medical costs and glycemic control: A retrospective analysis. *Cost Eff Resour Alloc.* v. 4, p. 1

OHMURA K, ISHIMORIN, OHMURA Y, TOKUHARA S, NOZAWA A, et al. 2010. Natural killer T cells are involved in adipose tissue inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v.30, p. 193–99

OKAMOTO H, MIZUNO K, HORIO T. 2003. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *Journal of dermatological science*, v. 31, p. 119–128.

OLEFSKY JM, GLASS CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* v. 72, p. 219–46

OLIVEIRA DL, FREIRE-DE-LIMA CG, NOSANCHUK JD, CASADEVALL A, RODRIGUES ML, NIMRICHTER L. 2010. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect immun.* v. 78, n. 4, p. 1601-9.

OLOFSSON SO, BOSTRÖM P, ANDERSSON L, RUTBERG M, PERMAN J, BORÉN J. 2009. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta.* v. 1791, n. 6, p. 448-58.

OSHIMA, K.; AOKI, N.; KATO, T.; KITAJIMA, K.; MATSUDA, T. 2002. Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles, *Eur. J. Biochem.* v. 269, p. 1209–1218.

PACHECO P, BOZZA FA, GOMES RN, BOZZA M, WELLER PF, CASTRO-FARIANETO HC, E COLS. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* v. 169, n. 11, p. 6498-506.

PALHINHA, LOHANNA, SALLY LIECHOCKI, EUGENIO D. HOTTZ, JÉSSICA APARECIDA DA SILVA PEREIRA, CECÍLIA J. DE ALMEIDA, PEDRO MANOel M. Moraes-Vieira, Patrícia T. Bozza, and Clarissa Menezes Maya-Monteiro. 2019. “Leptin Induces Proadipogenic and Proinflammatory Signaling in Adipocytes.” *Frontiers in Endocrinology* 10 (December).

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor, *Cell* v.33, p. 967–978.

PAN, YONG, XIAOYAN HUI, RUBY LAI CHONG HOO, DEWEI YE, CYRUS YUK CHEUNG CHAN, TIANSHI FENG, YU WANG, KAREN SIU LING LAM, AND AIMIN XU. 2019. “Adipocyte-Secreted Exosomal MicroRNA-34a Inhibits M2 Macrophage Polarization to Promote Obesity-Induced Adipose Inflammation.” *Journal of Clinical Investigation* 129 (2): 834–49. <https://doi.org/10.1172/JCI123069>.

PANIAGUA, J. A. 2016. “Nutrition, Insulin Resistance and Dysfunctional Adipose Tissue Determine the Different Components of Metabolic Syndrome.” *World Journal of Diabetes*, v. 7, n. 19, p. 483–514

PARDO, FABIÁN, ROBERTO VILLALOBOS-LABRA, BASTIÁN SOBREVIA, FERNANDO TOLEDO, AND LUIS SOBREVIA. 2018. “Extracellular Vesicles in Obesity and Diabetes Mellitus.” *Molecular Aspects of Medicine* 60: 81–91.

PATEL, J. V., A. ABRAHEEM, O. DOTSENKO, J. CREAMER, M. GUNNING, E. A. HUGHES, AND G. Y.H. LIP. 2008. “Circulating Serum Adiponectin Levels in Patients with Coronary Artery Disease: Relationship to Atherosclerotic Burden and Cardiac Function.” *Journal of Internal Medicine* 264 (6): 593–98.

PATTERSON, ELAIN E., PAUL M. RYAN, JOHN F. CRYAN, Timothy G. Dinan, R. Paul Ross, Gerald F. Fitzgerald, and Cath Erine Stanton. 2016. “Gut Microbiota,

Obesity and Diabetes.” *Postgraduate Medical Journal* 92 (1087): 286–300.

PEGTEL, D MICHIEL, AND STEPHEN J GOULD. 2019. “9-038. Exosomes.”

POL, EDWIN VAN DER, ANITA N. BÖING, PAUL HARRISON, AUGESTE STURK, AND RIENK NIEUWLAND. 2012. “Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles.” *Pharmacological Reviews* 64 (3): 676–705.

POSPICHALOVA, VENDULA, JAN SVOBODA, ZANKRUTI DAVE, ANNA KOTRBOVA, DOBROMILA KLEMOVA, LADISLAV ILKOVICS, ALES HAMPL, et al. 2015. “Simplified Protocol for Flow Cytometry Analysis of Fluorescently Labeled Exosomes and Microvesicles Using Dedicated Flow Cytometer” 3078 (March 2017).

POSTE, G.; NICOLSON, L. 1980. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* v.77, p. 399–403.

POYNTER ME, DAYNES RA. 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- $\kappa$ B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 49, p. 32833–32841.

PRADOS-ROSALES R, BAENA A, MARTINEZ LR, LUQUE-GARCIA J, KALSCHUEUR R, VEERARAGHAVAN U, CAMARA C, NOSANCHUK JD, BESRA GS, CHEN B, JIMENEZ J, GLATMAN-FREEDMAN A, JACOBS WR JR, PORCELLI SA, CASADEVALL A. 2011. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J Clin Invest*; v. 121, p. 1471-1483

QIAN, HONGWU, XIN ZHAO, RENHONG YAN, XIA YAO, SHUAI GAO, XUE SUN, XIMING DU, HONGYUAN YANG, CATHERINE C.L. WONG, AND NIENG YAN. 2020. “Structural Basis for Catalysis and Substrate Specificity of Human ACAT1. *Nature* 581 (7808): 333–38.

QUAIL, DANIELA F, AND ANDREW J DANNENBERG. The Obese Adipose Tissue Microenvironment in Cancer Development and Progression. *Nature Reviews Endocrinology*. v. 15, n. 3, p. 139–154.

RAKOTONIRINA-RICQUEBOURG, REBEKAH, VÍTOR COSTA, AND VITOR TEIXEIRA. 2021. “Hello from the Other Side: Membrane Contact of Lipid Droplets with Other Organelles and Subsequent Functional Implications.” *Progress in Lipid Research* 85 (September 2021): 101141.

R. C. N. MELO, R. C. N.; D’AVILA, H.; WAN, H. C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. 2011. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. v. 59, n. 5.

RAPOSO, GRAÇA, AND WILLEM STOORVOGEL. 2013. “Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends.” *Journal of Cell Biology* 200 (4): 373–83.

RAJARAM, M. V.; BROOKS, M. N.; MORRIS, J. D.; TORRELLES, J. B.; AZAD, A.K.; SCHLESINGER, L. S. 2010. Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol.* v. 185, n. 2, p. 929-42.

RAJARAM, M. V.; NI, B.; DODD, C. E.; SCHLESINGER, L. S. 2014. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol.* v. 26, n. 6, p. 471-85.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOOORVOGEL, W.; LIEJENDEKKER, R.; HARDING, C. V.; MELIEF, C. J.; GEUZE, H. J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J. Exp. Med.* v. 183, p. 1161–1172.

RAPOSO, G.; TENZA, D.; MECHERI, S.; PERONET, R.; BONNEROT, C. 1997. Desaynard, Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation, *Mol. Biol. Cell* v.8, p. 2631–2645.

RECORD, M., K. CARAYON, M. POIROT, AND S. SILVENTE-POIROT. 2014. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta* v. **1841**, p. 108-120.

RECORD, MICHEL, SANDRINE SILVENTE-POIROT, MARC POIROT, AND MICHAEL J.O. WAKELAM. 2018. "Extracellular Vesicles: Lipids as Key Components of Their Biogenesis and Functions." *Journal of Lipid Research* 59 (8): 1316–24.

RENNE, MIKE F., AND HANAA HARIRI. 2021. "Lipid Droplet-Organellar Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (September): 1–11.

RICOTE M, HUANG J, FAJAS L, et al. 1998. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* v. 95, n. 13, p. 7614–7619

RICOTE M, LI AC, WILLSON TM, KELLY CJ, GLASS CK. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* v. 391, n. 6662, p. 79-82.

RINGSEIS R, EDER K, MOOREN FC, KRÜGER K. 2015. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exercise Immunol Rev.* v. 21, p. 58-68.

RODRIGUES ML, NAKAYASU ES, OLIVEIRA DL, NIMRICHTER L, NOSANCHUK JD, ALMEIDA IC, CASADEVALL. 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *A Eukaryot Cell.* v. 7, n. 1, p. 58-67.

RILEY RL, MILLS CC, NYKA W, WEINSTOCK N, STOREY PB, SULTAN LU, E COLS. 1995. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. 1959. A two-year study of

contagion in a tuberculosis ward. *Am J Epidemiol.* v. 142, n. 1, p. 3-14.

ROBENEK MJ, SEVERS NJ, SCHLATTMANN K, PLENZ G, ZIMMER KP, TROYER D, E COLS. 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J.* v. 18, n. 7, p. 866-8.

ROSEN ED, SPIEGELMAN BM. 2001. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 37731-4.

SABINE A. EMING, THOMAS A. WYNN, PAUL MARTIN. 2017. "Inflammation and Metabolism in Tissue Repair and Regeneration." *Science.* v. 326, n. 6342, p. 8-12.

SAGHIZADEH M, ONG JM, GARVEY WT, HENRY RR, KERN PA. 1996. The expression of TNF  $\alpha$  by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J. Clin. Investig.* v. 97, p. 1111-16

SANTINHO, ALEXANDRE, VEIJO T. SALO, AYMERIC CHORLAY, SHIQIAN LI, XIN ZHOU, MOHYEDDINE OMRANE, ELINA IKONEN, AND ABDOU RACHID THIAM. 2020. "Membrane Curvature Catalyzes Lipid Droplet Assembly." *Current Biology* 30. v. 13, p. 2481-2494.e6.

SATOH T, TAKEUCHI O, VANDENBON A, YASUDA K, TANAKA Y, KUMAGAI Y, MIYAKE T, MATSUSHITA K, OKAZAKI T, SAITOH T, HONMA K, MATSUYAMA T, YUI K, TSUJIMURA T, STANDLEY DM, NAKANISHI K, NAKAI K, AKIRA S. 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol.* v. 11, n. 10, p. 936-44.

SCHOONJANS K, MARTIN G, STAELS B, AUWERX J. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* v. 8, n. 3, p.159-66.

SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1302, n. 2, p. 93-109

SCHRODER K, ZHOU R, TSCHOPP J. 2010. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* v. 327, p. 296-300

SHEN, M.; ZHOU, L.; ZHOU, P.; ZHOU, W.; LIN, X. 2017. Lymphotoxin  $\beta$  receptor activation promotes mRNA expression of RelA and pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in bladder cancer cells. *Mol Med Rep.*

SHI H, KOKOEVA MV, INOUE K, TZAMELI I, YIN H, FLIER JS. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Investig.* v. 116, p. 3015-25

SHIHO FUJISAKA, ISAO USUI, AGUSSALIM BUKHARI, MASASHI IKUTANI, TAKESHI OYA, YUKIKO KANATANI, KOICHI TSUNEYAMA, YOSHINORI NAGAI, KIYOSHI TAKATSU, MASAHARU URAKAZE, MASASHI KOBAYASHI AND KAZUYUKI TOBE. 2009. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes.* v. 58, n. 11, p. 2574-

2582.

SHOELSON S, LEE J, GOLDFINE A. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* v.116, p. 1793–801.

SICCO, C. L.; REVERBERI, D.; BALBI, C.; ULIVI, V.; PRINCIPI, E.; PASCUCCI, L.; BECHERINI, P.; BOSCO, M. C.; VARESI, L. FRANZIN, C.; POZZOBON, M.; CANCEDDA, R.; TASSO, R. 2017. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization

SIMONS, M.; RAPOSO, G. 2009. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 21, p. 575–581.

SMITH VL, CHENG Y, BRYANT BR, SCHOREY JS. 2017. Exosomes function in antigen presentation during an in vivo Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci Rep.* v. 7, p. 43578

SINGH, S. S.; SMITH, V. L.; KARAKOUSIS, P. Z. SCHOREY, J. S. 2012. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 2012; v. 189, n. 2, p. 777-85.

SRINIVASA, SUMAN, RUBEN GARCIA-MARTIN, MARTIN TORRIANI, KATHLEEN V. FITCH, ANNA R. CARLSON, C. RONALD KAHN, AND STEVEN K. GRINSPOON. 2021. “Altered Pattern of Circulating MiRNAs in HIV Lipodystrophy Perturbs Key Adipose Differentiation and Inflammation Pathways.” *JCI Insight* 6 (18): 1–20.

SOLINAS G, KARINM. 2010. JNK1 and IKK $\beta$ :molecular links between obesity andmetabolic dysfunction. *FASEB J.* v. 24, p. 2596–611

SONG MJ, KIM KH, YOON JM, KIM JB. 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 346, p. 739–45

SONG. M; HANA, L.; CHENA, F.; WANGA, D.; WANGA, F.; ZHANGA, L.; WANGA, L.; ZHONGA, M.; TANGA, M.; ZHANGA, W. 2018. Adipocyte-Derived Exosomes Carrying Sonic Hedgehog Mediate M1 Macrophage Polarization-Induced Insulin Resistance via Ptch and PI3K Pathways. *Cell Physiol Biochem.* v. 48. p. 1416-1432

SPALDING KL, ARNER E, WESTERMARK PO, BERNARD S, BUCHHOLZ BA, BERGMANN O, ET AL. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, v. 453, n. 7196, p. 783-7.

STEIN JM, LUZIO JP. 1991. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J.* 274 28

SUGANAMI, T.; NISHIDA J, OGAWA Y. 2005. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 25, n. 10,



p. 2062-8.

SUI, XUEWU, KUN WANG, NINA L. GLUCHOWSKI, SHANE D. ELLIOTT, MAOFU LIAO, TOBIAS C. WALTHER, AND ROBERT V. FARESE. 2020. "Structure and Catalytic Mechanism of a Human Triacylglycerol-Synthesis Enzyme." *Nature* 581 (7808): 323–28.

SZATANEK, R.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; ZIMOCZ, J.; LEKKA, M.; SIEDLAR, M.; BARAN, J. 2017. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int. J. Mol.* v. 18, p. 1153;

SZATMARI, I; TÖRÖCSIK, D.; AGOSTINI, M.; NAGY, T.; GURNELL, M.; BARTA, E.; CHATTERJEE, K.; NAGY, L. 2007. PPAR $\gamma$  regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood*. v. 110, n.9, p. 3271–3280.

TANIGAWA, KAZUNARI, YUQIAN LUO, AKIRA KAWASHIMA, MITSUO KIRIYA, YASUHIRO NAKAMURA, KEN KARASAWA, AND KOICHI SUZUKI. 2021. "Essential Roles of Ppars in Lipid Metabolism during Mycobacterial Infection." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (14).

TANSEY, J.; SZTALRYD, C.; HLAVIN, E.; KIMMEL, A.; LONDOS, C. 2008. The Central Role of Perilipin A in Lipid Metabolism and Adipocyte Lipolysis. *IUBMB Journals*. v. 56, n. 7, p. 379-385

TAUCHI-SATO K, OZEKI S, HOUJOU T, TAGUCHI R, FUJIMOTO T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*. v. 277, n. 46, p. 44507-12.

THIAM, ABDOU RACHID. 2020. "Lipid Droplet Nucleation." *Trends in Cell Biology*, 1–11.

THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In: *Current protocols in cell biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; p. Unit 3.22.

THÉRY, C. et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. v. 8, n. 1535750. P. 2001-3078

THÉRY, CLOTILDE, KENNETH W. WITWER, ELENA AIKAWA, MARIA JOSE ALCARAZ, JOHNATHON D. ANDERSON, RAMAROSON ANDRIANTSITOHAINA, ANNA ANTONIOU, et al. 2018. "Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines." *Journal of Extracellular Vesicles* 7 (1).

THERY, C., M. OSTROWSKI, AND E. SEGURA. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* v. 9, p. 581-593.

THERY, C., ZITVOGEL, L., AND AMIGORENA, S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* v.2, p. 569-579.

THERY, C.; CLAYTON, A.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology.* v.3, n. 22, p. 1-3.22.29.

THERY, C.; REGNAULT, A.; GARIN, J.; WOLFERS, J.; ZITVOGEL, L.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; AMIGORENA, S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73, *J. Cell Biol.* v. 147, p. 599–610.

TKACH, MERCEDES, AND CLOTILDE THÉRY. 2016. “Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go.” *Cell* 164 (6): 1226–32.

TONTONOZ P, SPIEGELMAN BM. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annual Review of Biochemistry.* v. 77, p. 289–312.

TONTONOZ PN, L.; ALVAREZ, J.G.; THOMAZY, V.A.; EVANS, R.M. 1998. PPAR gamma promotes monocytes/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* v. 93, n. 2, p. 241-252.

TSIKAS, D.; HANFF, E.; BRUNNER, G. 2017. *Helicobacter pylori*, Its Urease and Carbonic Anhydrases, and Macrophage Nitric Oxide Synthase. *Trends in Microbiology.* v. 25, n. 8, p. 602-603.

TZAMELI, I.; FANG, H.; OLLERO, M.; SHI, H.; HAMM, J. K.; KIEVIT, P. 2004. Regulation of production of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem,* v. 279, n. 34, p. 36093-102

VAN NIEL, G.; RAPOSO, C.; CANDALH, M. BOUSSAC, R.; HERSHBERG, N. CERF-BENSUSSAN, M. Heyman. 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles, *Gastroenterology.* v. 121, p.337–349.

VANDANMAGSAR, B.; YOUM Y. H.; RAVUSSIN, A.; GALGANI J. E.; STADLER, K.; MYNATT, R. L.; RAVUSSIN, E.; STEPHENS, J. M.; DIXIT, V. D. The nlrp3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. 2011. *Nat Med,* v. 17 p. 179-188.

VAN STIJN, C.M.; KIM, J.; LUSIS, A. J.; BARISH, G. D.; TANGIRALA, R. K. 2015. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. v. 29, n. 2, p. 636-49.

VARGAS G, ROCHA JD, OLIVEIRA DL, ALBUQUERQUE PC, FRASES S, SANTOS SS, NOSANCHUK JD, GOMES AM, MEDEIROS LC, MIRANDA K, SOBREIRA TJ, NAKAYASU ES, ARIGI EA, CASADEVALL A, GUIMARAES AJ, RODRIGUES ML, FREIRE-DE-LIMA CG, ALMEIDA IC, NIMRICHTER L. 2015. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol.* v. 17, n. 3, p. 389-407.

VILA-LIANTE V, SÁNCHEZ-LÓPEZ V, MARTÍNEZ-SALES V, et al. 2016. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clin Chem Lab Med.* v. 54, n. 11, p. 1759–1767.

VOJTECH, L., WOO, S., HUGHES, S., et al. 2014. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* v.42, p. 7290-7304.

von KNETHEN, A.; SOLLER, M.; BRÜNE, B. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and sepsis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* v. 55, p. 19–25.

WALTHER TC<sup>1</sup>, FARESE RV JR. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem.* v. 81, p. 687-714

WALTHER, TOBIAS C, JEEYUN CHUNG, AND ROBERT V FARESE JR. 2017. "Lipid Droplet Biogenesis," no. July: 1–20.

WAN, HC, MELO, RCN, JIN, Z, DVORAK, AM, WELLER, PF. 2007. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* v. 21, p. 167–178.

WEISBERG SP, HUNTER D, HUBER R, LEMIEUX J, SLAYMAKER S, et al. 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Investig.* v.116, p. 115–24

WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, FERRANTE AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Investig.* v. 112, p. 1796–808

WELLEN KE<sup>1</sup>, HOTAMISLIGIL GS. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* v. 112, n. 12, p. 1785-8.

WENTWORTH, JOHN M., GAETANO NASELLI, WENDY A. BROWN, LISA DOYLE, BELINDA PHIPSON, GORDON K. SMYTH, MARTIN WABITSCH, PAUL E O'BRIEN, AND LEONARD C. HARRISON. 2010. "Pro-Inflammatory CD11c+CD206+ Adipose Tissue Macrophages Are Associated with Insulin Resistance in Human Obesity." *Diabetes* 59 (7): 1648–56.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R.E, ET AL. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 86, n. 5, p. 1930-5.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 21/01/2020.

WILLIS, G. R.; GONZALEZ, A. F.; ANASTAS, J.; VITALI, S. H.; LIU, X.; ERICSSON, M.; KWONG, A.; MITSIALIS, S. A.; KOUREMBANAS, S. 2017. Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and

Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 197, n. 1.

WILLSON TM, LAMBERT MH, KLIEWER SA. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and metabolic disease. *Annual Review of Biochemistry*. v. 70, p. 341–367.

WINER S, CHAN Y, PALTSER G, TRUONG D, TSUIH, et al. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* v. 15, p.921–29

WOLINS, N. E. 2013. Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. *Adipocyte*, v .2, n. 2, p. 80-86

WOLINS, NE, RUBIN, B, BRASAEMLE, DL. 2001. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*. v. 276, p. 5101–5108.

XAVIER PRIEUR, CRYSTAL Y.L. MOK, VIDYA R. VELAGAPUDI, VANESSA NÚÑEZ, LUCÍA FUENTES, DAVIDMONTANER, KO ISHIKAWA, ALBERTO CAMACHO, NURIA BARBARROJA, STEPHEN O'RAHILLY, JASWINDER K. SETHI, JOAQUIN DOPAZO, MATEJ OREŠIČ, MERCEDES RICOTE AND ANTONIO VIDAL-PUIG. 2011. Differential Lipid Partitioning Between Adipocytes and Tissue Macrophages Modulates Macrophage Lipotoxicity and M2/M1 Polarization in Obese Mice. *Diabetes*. v. 60, n. 3, p. 797-809

XU, M. and WANG, X. 2017. Critical roles of mucin-1 in sensitivity of lung cancer cells to tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. *Cell Biol Toxicol*.

XU H, BARNES GT, YANG Q, TAN G, YANG D, et al. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Investig.* v. 112, p. 1821–30

XUE, X.; QIU, Y.; YANG, H. L. 2017. Immunoregulatory Role of MicroRNA-21 in Macrophages in Response to *Bacillus Calmette-Guerin* Infection Involves Modulation of the TLR4/MyD88 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, v. 42, n. 1, p.91-102.

YAN, Z.; WANG, H.; MU, L.; HU, Z. D.; ZHENG, W. Q. 2021. Regulatory roles of extracellular vesicles in immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection Zhi Yan, Hua Wang, Lan Mu, Zhi-De Hu, Wen-Qi Zheng. *World J Clin Cases*. v.9, n. 25, p. 7311-7318

YAQIN, Z.; HONGLIANG, M.; XIAOAI, C.; FANG, C.; YUNXIA, Z.; XIAO, H. 2016. Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. *Journal of Molecular Cell Biology*.

YUANA Y, BERTINA RM, OSANTO S. 2011. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* v. 105, n. 3, p. 396–408.

YODA-MURAKAMI, M., M. Taniguchi, K. Takahashi, S. Kawamata, K. Saito, N. H. Choi Miura, and M. Tomita. 2001. “Change in Expression of GBP28/Adiponectin in Carbon

Tetrachloride-Administrated Mouse Liver.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285 (2): 372–77. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5134>.

YUANA Y, BÖING AN, GROOTEMAAT AE, et al. 2015. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracelular vesicles. *J Extracell Vesicles*. v.4, p. 29260

YU, XIAOJIE, MARGARETE ODENTHAL, AND JOCHEN W.U. FRIES. 2016. “Exosomes as MiRNA Carriers: Formation-Function-Future.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12).

ZHANG, BO, YANG YANG, LIN XIANG, ZHIHE ZHAO, AND RUI YE. 2019. “Adipose Derived Exosomes: A Novel Adipokine in Obesity-Associated Diabetes.” *Journal of Cellular Physiology* 234 (10): 16692–702. <https://doi.org/10.1002/jcp.28354>.

ZHANG, Y., LIU, D., CHEN, X., et al. 2010. Secreted monocytic miR-150 enhance targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell* v. 39, p. 133-144.

ZHAO, HUI, QIANWEN SHANG, ZHENZHEN PAN, YANG BAI, ZEQUAN LI, HUIYING ZHANG, QIU ZHANG, CHUN GUO, LINING ZHANG, AND QUN WANG. 2018.

“Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue.” *Diabetes* 67 (2): 235–47. <https://doi.org/10.2337/db17-0356>.

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I.; TSCHOPP, J. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, v. 11, p. 136-140.

ZINGARELLI B, SHEEHAN M, HAKE PW, O'CONNOR M, DENENBERG A, COOK JA. 2003. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy Delta(12,14)- prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* v. 171, n. 12, p. 6827-37.

