

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

**Letícia Ludmilla de Oliveira**

**EFEITO DE EXOSSOMOS DO TECIDO ADIPOSEO DE  
CAMUNDONGOS OBESOS NA POLARIZAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2021

**LETÍCIA LUDMILLA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DE EXOSSOMOS DO TECIDO ADIPOSEO DE  
CAMUNDONGOS OBESOS NA POLARIZAÇÃO DE  
MACRÓFAGOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientadora: Profa. Dra. Jacy Gameiro**

**Co-orientadora: Dra. Ana Cristina Moura Gualberto**

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

de Oliveira, Letícia Ludmilla .

Efeito de Exossomos do Tecido Adiposo de Camundongos Obesos na Polarização de Macrófagos / Letícia Ludmilla de Oliveira. -- 2021.

95 p.

Orientadora: Jacy Gameiro

Coorientadora: Ana Cristina Moura Gualberto

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

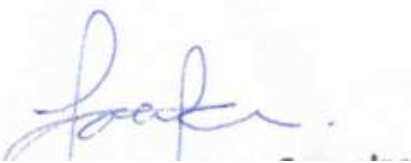
1. Vesículas Extracelulares. 2. Exossomos. 3. Tecido Adiposo. 4. Obesidade. 5. Macrófagos. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Moura Gualberto, Ana Cristina, coorient. III. Título.

**LETÍCIA LUDMILLA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DE EXOSSOMOS DO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS  
OBESOS NA POLARIZAÇÃO MACRÓFAGOS**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14/09/2021.

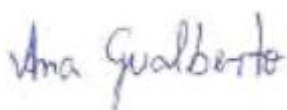


---

**Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro**

**Orientadora**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



---

**Dr.ª Ana Cristina Moura Gualberto**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



---

**Prof.ª Dr.ª Patricia Resende Alo Nagib**

**Universidade Federal de Goiás**

*“O trabalho duro é inútil para quem não acredita em si mesmo.”*

Maito Gai.

## AGRADECIMENTOS

O sentimento que tenho ao chegar até aqui é realmente de gratidão! Por tudo que passei durante a construção desse trabalho, às coisas boas, mas também às não tão boas assim, que foram igualmente fundamentais ao meu processo contínuo de construção!

À Universidade Federal de Juiz de Fora e às políticas públicas que permitiram que eu chegasse (e permanecesse) até aqui. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, CAPES, FAPEMIG, UFJF CNPq pelo suporte técnico e financeiro.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio ao longo dessa jornada. Por acreditarem na minha capacidade. Por todo esforço em garantir as oportunidades que não tiveram e por entenderem minhas ausências. À minha irmã, Lícia, pela amizade e momentos de irreverência.

Ao Marcinho por me incentivar desde o início no meu caminho como bióloga. Pelo amor, carinho e paciência, principalmente nessa reta final.

Aos meus amigos e companheiros diários de desespero, Raphael e Juliana. Por todas as risadas e por mesmo longe continuarem presentes.

À Paula Dib que me acolheu desde a iniciação científica e que nunca mais soltou minha mão (apesar de desaparecer e se comunicar por sinal de fumaça). Pela amizade e companhia em todos os momentos. Pela empolgação e toda ajuda desde sempre.

Cecilliaaa, pela amizade e pelos surtos compartilhados.

Aos meus amigos de laboratório, Sara, Luan, Victória, Gabi, pelo acolhimento, ensinamentos e amizade. À Maria Clara e Mariana, pelas conversas e parceria durante as disciplinas e momentos de desespero. Ao Davi pela companhia nos meses finais e por ser o fornecedor oficial de Coquinhas.

A todos os companheiros do LIDIPO por fazerem da rotina do laboratório mais leve e pelas comemorações das pequenas - grandes coisas, que são as mais importantes.

Ao Diego por me apresentar o mundo das vesículas extracelulares, pelos ensinamentos, apoio em companhia, principalmente durante o uso da ultracentrífuga.

À minha co-orientadora Aninha, minha chefe, por sempre me lembrar que a vida pode ser mais leve. Pela orientação, pela parceria nesses últimos meses. Por me acolher e puxar minha orelha quando necessário.

À minha orientadora Jacy, pela oportunidade e acolhimento. Por acreditar e confiar em mim mais do que eu mesma e me enxergar de maneira tão positiva. Pela leveza nos momentos da finalização desse trabalho e pela #dissertacaoterapia.

À todos aqueles que permitiram que esse trabalho se tornasse realidade. À Leidinha, colegas e professores do IMUNOCET e LIDIPO, Rogério e Bárbara do LIP, ao Laboratório de Biologia Celular e Laboratório de Imunotrombose.

A todos os professores que de alguma forma me marcaram e me motivaram a trilhar esse caminho.

Às professoras da banca examinadora pela disponibilidade em participar e contribuir com este trabalho e minha formação.

## RESUMO

O crescimento em escala mundial no número de casos de obesidade é alvo de preocupação, principalmente devido a essa condição ser fator de risco para o desenvolvimento de outras comorbidades decorrentes do processo inflamatório crônico no tecido adiposo. Este tecido é capaz de se comunicar através de hormônios, mediadores inflamatórios, e estudos recentes descrevem a importância de vesículas extracelulares nesse processo, com estas podendo de interagir inclusive com o sistema imune. Das células imunes, os macrófagos são as que estão presentes em maior número no tecido adiposo, já sendo relatado que no contexto da obesidade estas se encontram direcionadas ao perfil pró-inflamatório. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar como exossomos do tecido adiposo murino obeso interagem com macrófagos. Para isso animais C57BL/6 foram submetidos ao modelo de obesidade, o tecido adiposo perigonadal foi coletado para obtenção das vesículas, além da coleta da medula óssea do grupo controle para a diferenciação em macrófagos. Foi realizada a padronização da obtenção dos exossomos por centrifugação e ultracentrifugação, com o tamanho sendo avaliado pelo DLS e a quantidade de proteína pelo kit de BCA, com os dados encontrados até o momento sendo corroborados pelos encontrados na literatura. Foi estabelecida a concentração de trabalho dos exossomos (25 e 50 µg/mL) e realizada a padronização da obtenção de macrófagos derivados da medula óssea. A eficiência do método de diferenciação de macrófagos foi verificada através da análise da expressão de F4/80 por citometria de fluxo. Em seguida, as vesículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, morfologia, presença de marcadores específicos e quantidade de proteínas. Macrófagos de cultura primária foram então tratados com os exossomos e avaliados quanto a mediadores produzidos e perfil de polarização.

Palavras-chave: Vesículas Extracelulares, Exossomos, Tecido Adiposo, Obesidade, Macrófagos.



## ABSTRACT

The worldwide growth in the number of obesity cases is a matter of concern, mainly because this condition is a risk factor for the development of other comorbidities resulting from the chronic inflammatory process in the adipose tissue. This tissue can communicate through hormones, inflammatory mediators, and recent studies describe the importance of extracellular vesicles in this process, with these being able to interact even with the immune system. Of the immune cells, macrophages are the ones that are present in greater numbers in the adipose tissue, and it has been reported that, in the context of obesity, they are directed towards a pro-inflammatory profile. Thus, the objective of this work is to evaluate how exosomes from obese murine adipose tissue interact with macrophages. For this, C57BL/6 animals were submitted to the obesity model, the adipose tissue gonadal fat was collected to obtain the vesicles, in addition to the collection of bone marrow from the control group for differentiation into macrophages. The standardization of the obtainment of exosomes by centrifugation and ultracentrifugation was carried out, with the size being evaluated by the DLS and the amount of protein by the BCA kit, with the data found so far being corroborated by those found in the literature. The working concentration of exosomes (25 and 50 µg/mL) was established and the standardization of obtaining bone marrow-derived macrophages was carried out. The efficiency of the macrophage differentiation method was verified by analyzing the expression of F4/80 by flow cytometry. Then, the vesicles were characterized in terms of size, morphology, presence of specific markers and amount of proteins. Primary culture macrophages were then treated with exosomes and evaluated for mediators produced and polarization profile.

Extracellular Vesicles, Exosomes, Adipose Tissue, Obesity, Macrophages.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARG-1	Arginase
ATCC	do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CCL3	Ligante 3 de quimiocina
CCL4	Ligantes 4 de quimiocina (motivo C-C)
CCL22	Quimiocina com motivo C-C 22
CD 9	Proteína membro da superfamília transmembrana 4,
CD 37	Antígeno leucocitário CD37
CD40	Proteína coestimuladora
CD53	Antígeno de superfície de leucócitos CD53
CD63	Proteína membranas de vesículas intracelulares
CD81	Alvo do anticorpo antiproliferativo
CD 82	Antígeno CD82
CD 83	Antígeno CD83
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CXCL8	Ligante 8 de quimiocina de motivo C-X-C
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DAMPs	Padrões Moleculares associados ao Dano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	do Inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FSC	do Inglês <i>Forward Scatter</i>
HIF1- $\alpha$	Fator 1-alfa induzível por hipóxia
HFD	Dieta hiperlipídica
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon do tipo gama
iNOs	Óxido Nítrico Sintase Induzida
LAMP1	Proteína 1 de membrana associada a lisossomos
LDNano	Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados
LEP	Gene da Leptina
LEPR	Receptor de Leptina
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos ativados alternativamente
MCSF	Macrófagos classicamente ativados
MCP-1	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MC4R	Receptor de melanocortina 4
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	Medianas de intensidade de fluorescência
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
mRNA	RNA mensageiro
miRNA's	Micro RNA
MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NEED	N-1-naphtilethtilenodiamina
NLRP3	Domínio pirina da família NLR contendo 3
nK	Células <i>natural killer</i>
NTRK2	Receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo 2
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão de fosfato

PCSK1	Proteína convertase 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POMC	Pró-opiomelanocortina
RabGTPase	Superfamília Ras de pequenas trifosfatases de guanosina
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	do Inglês <i>Roswell Park Memorial Medium</i>
RT	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SIM1	Homólogo 1 unilateral,
SNAREs	Receptor de fixação de NSF solúvel
SSC	Do inglês <i>side fluorescence</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TBST	Solução salina tamponada com tris e Polissorbato 20
tRNA	RNA transportador
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSG101	Gene de suscetibilidade a tumores 101
VE's	Vesículas Extracelulares
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	do Inglês <i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
NaCl	Cloreto de sódio
Kg	Kilogramas
mL	Mililitro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
µm	Micrometros
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
mM	MicroMolar
µg	Micrograma
mA	Microâmpere
pH	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
NO <sup>2-</sup>	Nitrito
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
H <sub>2</sub> O	Água

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Liberação e formação de microvesículas e exossomos.....	19
<b>Figura 2</b> – Desenho experimental.....	24
<b>Figura 3</b> – Esquema do protocolo de obtenção de vesículas extracelulares.....	27
<b>Figura 4</b> – Peso corporal dos camundongos C57BL/6.....	41
<b>Figura 5</b> – Consumo de ração por gaiola ao longo das semanas.....	42
<b>Figura 6</b> – Peso da gordura perigonadal dos animais.....	43
<b>Figura 7</b> – Tamanho dos Exossomos.....	44
<b>Figura 8</b> – Tamanho das Microvesículas.....	45
<b>Figura 9</b> – Citometria de fluxo F4/80.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Ingredientes utilizados para o preparo de 1kg de ração hiperlipídica..	26
<b>Tabela 2</b>	– Primers a serem utilizados para a realização para a avaliação dos perfis dos macrófagos tratados com as vesículas extracelulares.....	38
<b>Tabela 3</b>	– Marcadores de macrófagos para os perfis M1 e M2.....	39
<b>Tabela 4</b>	– Tabela com os valores da média $\pm$ desvio padrão dos valores encontrados para quantidade de proteínas nas amostras de microvesículas e exossomos através da dosagem pelo kit de BCA.....	46
<b>Tabela 5</b>	– Parâmetros a serem avaliados para a caracterização das vesículas extracelulares obtidas no estudo.....	48
<b>Tabela 6</b>	– Parâmetros a serem avaliados para a determinação dos perfis M1 e M2 nos macrófagos avaliados nos ensaios funcionais.....	49
<b>Tabela 7</b>	– Cronograma proposto para as próximas etapas do trabalho.....	49

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	6
2.1 OBESIDADE.....	6
2.2 FATORES GENÉTICOS E OBESIDADE.....	9
2.3 TECIDO ADIPOSEO.....	10
2.4 RESPOSTA IMUNE .....	16
2.5 TRANSDUTORES DE SINAL E ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO (STATs)...	21
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 ANIMAIS.....	34
4.2 MODELO DE OBESIDADE .....	34
4.3 OBTENÇÃO DOS EXOSSOMOS.....	35
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS.....	36
4.4.1 Tamanho dos exossomos .....	36
4.4.2 Quantificação proteica .....	37
4.5 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMs).....	37
4.5.1 Cultura de Células L929.....	37
4.7 PCR EM TEMPO REAL.....	40
4.7.1 Extração de RNA.....	40
4.7.2 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	41
4.7.3 Avaliação da expressão dos mRNAs .....	41
4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS .....	43
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
5 RESULTADOS .....	45
5.1 MODELO DE OBESIDADE .....	45
5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM EXOSSOMOS DO TECIDO ADIPOSEO .....	49
5.5 DOSAGEM DE CITOCINA.....	54
6 DISCUSSÃO .....	57
7 CONCLUSÃO .....	64



## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade pode ser definida pelo acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo, ou ainda pelo aumento do peso corporal devido ao excesso de gordura, quando comparada a valores pré-estabelecidos pela OMS (MARTI, 2001). Esta condição foi inicialmente considerada como um problema nos países desenvolvidos, entretanto, atualmente apresenta número de casos crescente também nos demais países. Os casos de obesidade ultrapassam o número de desnutridos (com exceção de regiões da África Subsaariana e Ásia) e é considerado um problema mundial ainda sem abordagens terapêuticas bem estabelecidas (WHO, 2021).

Mudanças nos hábitos alimentares, na rotina da população, combinados a fatores genéticos são responsáveis pela atual epidemia da obesidade, que representa um fator de risco para doenças crônicas como doenças cardiovasculares, cânceres, diabetes, além de desordens metabólicas e musculoesqueléticas (SIKARIS, 2004; JAMES, 2008; CHAWLA, 2011; CRINO, 2015; WHO, 2021). O desenvolvimento dessas patologias está relacionado ao estado inflamatório crônico e de baixo grau presente no indivíduo obeso, caracterizada por um infiltrado celular que contribui para a secreção aumentada de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo (HEREDIA, 2012; SELL, 2012; MAURIZI, 2018; SASAKI, 2019).

Já há alguns anos, as funções do tecido adiposo foram extrapoladas para além de reserva energética, proteção mecânica e termorregulação. Nas últimas décadas houve um maior esforço científico em busca da elucidação de suas funções, o que permitiu a compreensão da atividade desse tipo tecidual, bem como de suas células residentes, em diversos processos homeostáticos e de comunicação (CHAIT, 2020).

Embora alguns aspectos ainda necessitem serem mais bem elucidados, o papel endócrino do tecido adiposo é bem estabelecido e revela seu papel dinâmico em diversos processos metabólicos e fisiológicos. Os adipócitos secretam diversas moléculas bioativas, fatores de crescimento,

hormônios, quimiocinas. Tais células secretam substâncias chamadas de adipocinas, que são importantes mediadores de processos metabólicos, na qual o padrão de secreção está relacionado com microambiente tecidual (CHAIT, 2020).

As adipocinas são moléculas bastante diversas, tanto por sua estrutura como por sua função. Dentro dessa nomenclatura estão inclusas citocinas clássicas secretadas pelo tecido adiposo como TNF- $\alpha$ , diversas interleucinas, como hormônios relacionados ao metabolismo, como a leptina, adiponectina e resistina (SIKARIS, 2004; TRAYHURN, 2005; SÁNCHEZ, 2011; MASOODI, 2015, CHAIT, 2020)

Além de adipócitos em diferentes estágios de maturação, diversas células compõem o tecido adiposo como os fibroblastos, células endoteliais, diferentes células imunes, como macrófagos de diferentes fenótipos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* (NK). Estas células participam da homeostase tecidual ou do processo inflamatório observado na obesidade (CURAT, 2004; CHAWLA, 2011; ZHANG, 2016; MAURIZI 2017).

A comunicação celular é crucial para a manutenção da homeostase do organismo. Esse processo pode ocorrer através de moléculas solúveis e estudos recentes destacam que também pode ocorrer pela liberação de vesículas produzidas por diversos tipos celulares, as quais desempenham diferentes papéis em processos como inflamação e câncer (VIEIRA, 2016; ZHANG, 2016). Já foi demonstrado que vesículas extracelulares produzidas e liberadas por adipócitos são capazes de interagir com o sistema imunológico, promovendo sinalização e recrutamento de monócitos e macrófagos (EGUCHI, 2015).

O termo vesículas extracelulares se refere a uma gama heterogênea de vesículas secretadas que possuem membrana de bicamada lipídica. Considerando a morfologia e diâmetro, diferentes terminologias são utilizadas. Duas grandes categorias são propostas baseadas na biogênese: exossomos e microvesículas, em que os primeiros possuem origem endossomal, medindo de 30 – 150 nm (com esses valores sendo variáveis na literatura) enquanto as últimas se originam de brotamentos na membrana plasmática e medem entre 100 e 100nm (KUWABARA, 2015; NIEK, 2018; WORTZEL, 2019).



## **REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OBESIDADE

Durante o século passado, doenças infecciosas eram as responsáveis pela maior parte dos óbitos. No entanto as melhorias nas condições econômicas, sociais, culturais e até mesmo tecnológicas deslocaram essa mortalidade para as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (OPAS, 2020). Desde o final dos anos 90, as DCNT's, são alvo de preocupação por organizações internacionais, como a World Health Organization (WHO,2021), tanto no cenário de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, já que ambos seguem a mesma tendência de crescimento desses tipos de comorbidades.

As DCNT's são doenças com longa duração, resultado da combinação de fatores genéticos, fisiológicos, comportamentais, impulsionadas por fatores ambientais, como a urbanização não planejada, acelerada e a globalização. Além disso, o aumento da incidência dessa enfermidade está relacionado ao aumento da longevidade dos indivíduos. Estas doenças afetam de maneira desproporcional a população, sendo que em países de baixa e média renda, mais de três quartos das mortes estão associadas as DCNT's, com está considerada a principal causa de morte em países da América do Sul, e representa cerca de 71% das mortes globais (BRASIL,2019; WHO, 2021; OPAS, 2020).

Entre as DCNTs, a obesidade tem recebido destaque. Nos últimos trinta anos, a prevalência dessa condição aumentou quase 28% em relação a adultos e aproximadamente 48% entre as crianças (APOVIAN,2016). Desde os anos 80, os índices de obesidade e do sobrepeso aumentou em todo o mundo, dados de 2013 demonstraram que a obesidade e o sobrepeso atingiram cerca de 28% dos adultos da população mundial, apesar dessa condição ainda ser predominante nos países desenvolvidos (BRASIL, 2005; MCLELLAND, 2016).

A definição exata da causa da obesidade ainda é desconhecida, consequência da complexa relação de fatores biológicos, psicológicos, sociais e comportamentais, nos quais estão presentes fatores como a genética e

epigenética do indivíduo, microbiota, ciclo circadiano, fatores endócrinos, questões socioeconômicas e culturais (SKELTON, 2011). As escolhas alimentares, decorrentes do ambiente social no qual o indivíduo está inserido também desempenham um papel importante, já que essas influenciam na quantidade e qualidade das calorias ingeridas (SWINBURN, 2011).

De modo geral, a obesidade pode ser definida como uma condição crônica, resultado do ganho de peso em decorrência do acúmulo de gordura corporal, consequência de um superávit no aporte calórico. A OMS adota o método antropométrico do Índice de Massa Corporal (IMC), como um critério básico para a definição da obesidade, uma medição embasada na relação entre o peso e a sua proporção ao quadrado da altura, considerados como indivíduos obesos aqueles que possuem um IMC igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, sendo esse valor um consenso e independente do sexo ou idade do indivíduo (WHO,2000; ENGIN, 2017).

Os valores do IMC são amplamente utilizados para avaliações epidemiológicas, auxiliando na obtenção de estimativas a respeito do sobrepeso e obesidade, sendo útil nas avaliações acerca da morbidade e mortalidade dessa condição na população, além de possuir um papel na etapa inicial da triagem de pacientes obesos (BRAY, 2018). Entretanto, justamente pela simplicidade do método, ao ser calculado desconsiderando-se a idade e as variações corporais de cada um, o IMC demonstra algumas limitações, já que não leva em consideração indicadores da composição corporal e dessa forma é incapaz de saber se seu valor está associado ao peso de massa magra ou gorda, apresentando baixa sensibilidade para identificar o excesso de gordura corporal nos indivíduos (OKORODUDU,2010).

Em alguns casos, o valor encontrado para o IMC pode ser falsamente saudável, no mesmo sentido, a alta concentração de gordura corporal pode estar associada a desregulação metabólica sem que exista uma relação direta com o peso corporal. O IMC também se mostra inespecífico em distinguir como a gordura corporal está distribuída, uma medida importante para o diagnóstico de síndromes metabólicas como o diabetes e doenças

cardiovasculares por exemplo (OKORODUDU,2010; DÉSPRES, 2012; BRAY,2018).

O sistema de estadiamento da obesidade de Edmonton foi criado para auxiliar as medidas já existentes, classifica o excesso de adiposidade em uma escala de 5 pontos e considera as comorbidades relacionadas à obesidade e o status funcional da pessoa, dessa forma pode ser considerado um forte preditor independente de aumento da mortalidade, entretanto, ele ainda não foi incorporado a prática clínica (APOVIAN, 2016). Dessa forma, a ausência de outros indicadores ainda faz com que o IMC seja o método mais utilizado e por isso, atualmente, ele vem sendo correlacionado a outras medidas de adiposidade que permitem estimar melhor a distribuição da gordura corporal, como métodos de biopedância e medidas da circunferência abdominal, cintura e quadril que são capazes de prover informações que predizem, por exemplo o risco cardiometabólico que não podem ser determinados pelo IMC elevado (YUSUF, 2005; BRAY, 2018).

Entre os anos de 1975 e 2016 a prevalência da obesidade praticamente triplicou, segundo dados do WHO (2020). No ano de 2016, mais de 650 milhões de adultos eram obesos, com esse valor correspondendo a cerca de 13% da população mundial, distribuindo entre 11% dos homens e 15% das mulheres. Dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizada pelo do Ministério da Saúde, indicam crescimento na prevalência da obesidade entre a população brasileira no período de 2006 a 2018, saindo de 11,8% e chegando em 19,8%, um aumento de 67,8%.

A pesquisa também demonstra que um crescimento no índice da população acima do peso, partindo de 30,8% e atingindo 55,7% em 2018, sendo a população do sexo masculino e da faixa etária entre 18 e 24 anos a mais afetada. Além disso, o crescimento da obesidade foi maior entre os adultos de 25 a 44 anos, com as mulheres apresentando uma taxa sutilmente maior em relação aos homens, sendo de 20,7% e 18,7%, respectivamente (BRASIL,2020).



## 2.2 FATORES GENÉTICOS E OBESIDADE

A suscetibilidade ao ganho de peso que leva a obesidade pode estar relacionada a propensão genética de cada indivíduo e, nesse caso, o fator genético da obesidade está relacionado a variantes gênicas que geram impacto na adiposidade. Cerca de oito genes, com papel na diferenciação neuronal do núcleo paraventricular e na via leptina / melanocortina já tiveram relatados seu envolvimento na obesidade, são eles: da leptina (LEP), receptor de leptina (LEPR), proopiomelanocortina (POMC), pro hormônio convertase 1 (PCSK1), receptor de melanocortina 4 (MC4R ), homólogo obstinado 1 (SIM1), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu receptor TrkB codificado pelo gene do receptor neurotrófico de tirosina quinase tipo 2 (NTRK2) (CHOQUET,2011).

A inativação, mesmo que incompleta, de alguns desses genes pode levar o indivíduo a hiperfagia que resulta em obesidade precoce. Acredita-se que o aspecto genético da obesidade possa estar relacionado a um único gene ou ser resultado da ação conjunta de vários genes, cada qual contribuindo com um aspecto fenotípico da condição (CHOQUET,2011; REDDON, 2016).

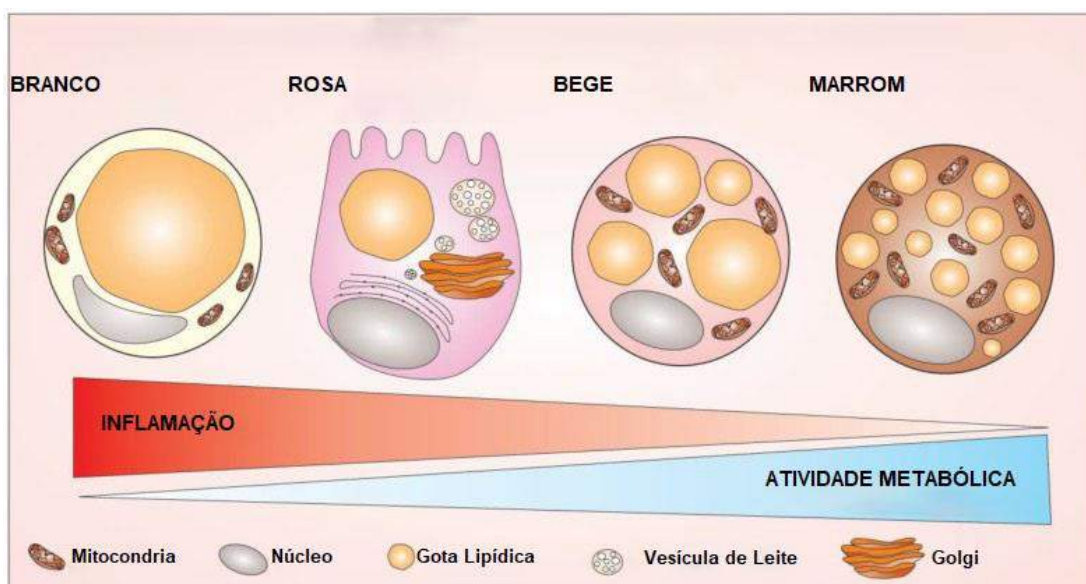
Além disso, alterações nas funções gênicas, mesmo sem que ocorra alterações nas sequências do DNA (Ácido Desoxirribonucleico), podem resultar em alterações metabólicas que levam a obesidade, os chamados fatores epigenéticos. Nesse caso, ocorrem alterações químicas e reversíveis no material genético ou nas proteínas cromossômicas, as histonas, como variações no empacotamento da molécula de DNA, metilação gênica ou ação de RNA's (Ácidos Ribonucleicos) não codantes, capazes de alterar o acesso da maquinaria celular a determinados genes, sendo está uma espécie de resposta a variações ambientais presentes em diferentes estágios da vida (OGREN, 2008; REDDON, 2016; HAEMER, 2009, LEE,2014).

Embora ainda não se tenha levado em consideração marcadores epigenéticos específicos, alguns estudos indicam que as exposições vivenciadas no ambiente materno podem afetar o fenótipo do indivíduo ao longo da vida, onde, por exemplo, um ambiente materno escasso em micronutrientes durante o desenvolvimento embrionário pode estar associado a

um maior risco de doenças crônicas, como a obesidade. Além disso, as vivências dos primeiros anos de vida também parecem ter um papel importante, como demonstrado em estudos que consideram o período de amamentação e a prevalência da obesidade, sendo observado que os indivíduos que foram amamentados por mais tempo apresentaram um risco menor de obesidade (HAEMER, 2009; DJIK, 2015; JIRTLE, 2007; GILLMAN, 2008; LEE, 2015).

### 2.3 TECIDO ADIPOSEO

Os adipócitos são as células mais abundantes do tecido adiposo. Estas células apresentam gotas lipídicas em seu interior, sendo estas o local de armazenamento energético sob a forma de triglicerídeos. De modo geral, o tecido adiposo possui número pré-determinado de adipócitos em sua composição, com esse valor variando de acordo com o ambiente vivenciado na infância e na adolescência de cada indivíduo (JUNG, 2014).



**Figura 1:** Desenho esquemático dos quatro tipos de tecido adiposo. Da esquerda para a direita: Tecido adiposo branco, com função secretora e de armazenamento energético; Tecido adiposo rosa, papel no armazenamento energético, porém com maior atividade metabólica; Tecido adiposo bege, intermediário ao tecido adiposo branco e marrom, com função de armazenamento energético e produção de calor; Tecido adiposo marrom, alta atividade metabólica e função termorreguladora (Adaptado de CORREA, 2019).

O tecido adiposo é considerado um órgão formado por diversos depósitos viscerais, cutâneos e perivasculares, com funções metabólicas e regulatórias plásticas, apresentando além dos adipócitos variados tipos de células imunes, fibroblastos e células endoteliais, todos envolvidos pela matriz extracelular. De acordo com a região, esse órgão pode apresentar diferentes composições, com características regulatórias, morfológicas e funcionais variadas. Dessa forma, este tipo tecidual é classificado como tecido adiposo branco, marrom, bege e rosa (Figura 1), havendo grande adaptabilidade desse tecido o que proporciona a transdiferenciação entre eles (KERSHAW, 2004; FANTUZZI, 2005; CORREA, 2019; HEYN, 2020).

Os adipócitos marrons são conhecidos pelo citoplasma com numerosas mitocôndrias ricas em proteína desacopladora-1 (UCP1), também chamada de termogenina, em sua membrana externa, necessárias para a dissipação de energia sob a forma de calor devido a sua função de termogênese. Estas células oxidam seus depósitos de gordura, que leva ao aumento da taxa metabólica e produção de calor (MARLATT, 2017).

Por consequência de seu papel na produção de calor, por muito tempo, o tecido adiposo marrom foi considerado presente apenas em animais hibernante e, no caso de seres humanos, presente apenas em recém-nascidos. Entretanto, estudos atuais já demonstraram a presença funcional desse tecido nas regiões do pescoço e interescapular de indivíduos adultos (OUELLET, 2012; CORREA, 2019).

O tecido adiposo marrom pode ainda ser formado através do processo de transdiferenciação de adipócitos brancos, e, de modo similar, dependente do estímulo, também são capazes de se diferenciar, transformando-se em tecido adiposo bege ou branco (CORREA, 2019). Estudos vem demonstrando que esse tecido é metabolicamente ativo, sendo capaz de influenciar em respostas fisiológicas com a regulação do peso corporal e da glicose através da liberação de moduladores circulantes, além de fatores conhecidos como batocinas que são capazes de interagir com o sistema imune (MARLATT, 2017; SRIVASTAVA, 2019; HEYN, 2020).

O tecido adiposo bege, por sua vez, pode ser considerado como um tipo de adipócito intermediário entre o branco e o marrom, podendo apresentar a capacidade de termogênese, quando induzida pela presença de fatores ambientais como exposição intensa ao frio ou atividades físicas, sendo essa mudança reversível de acordo com o estímulo (JUN,2012; CORREA, 2019).

Esse tecido é caracterizado pela presença de adipócitos multiloculares, denso em mitocôndrias e com um importante papel na regulação da glicose, sendo atualmente alvo de grande interesse como um potencial alvo terapêutico no tratamento de distúrbios metabólicos (GIORDANO, 2014; IKEDA, 2018; CORREA, 2019; HEYN, 2020). Durante a gravidez e a lactação, os adipócitos brancos também podem sofrer processo de transdiferenciação, transformando-se em um quarto tipo de adipócito, conhecido como adipócito rosa. Essas células se assemelham a células alveolares secretoras de leite, com núcleo central e arredondado, com citoplasma repleto de gotas lipídicas, grânulos de leite em seu interior e apresentam sua superfície apical rica em microvilosidades (CORREA,2019).

No que se refere a estocagem energética, destaca-se o tecido adiposo em maior abundância, o tecido adiposo branco, onde os ácidos graxos estão estocados em uma grande gota lipídica unilocular presente no citoplasma da célula (CORREA, 2019). No entanto, eles também são consideravelmente responsáveis por funções endócrinas, já que participam ativamente da secreção de variados ativos metabólicos dos quais se pode destacar a leptina e a adiponectina (AHIMA, 2000; KERSHAW, 2004).

O tecido adiposo branco é o que mais sofre remodelamento no contexto da obesidade, com alterações hiperplásicas e hipertróficas de suas células que resultam em expansão tecidual, alterações mitocondriais, hipóxia, fibrose e contribuindo para o desenvolvimento de processos inflamatórios (WELLEN, 2003; RAUSCH, 2009; ARNER, 2010, JUNG, 2014).

Ao mesmo tempo em que essa expansão tecidual e alterações metabólicas ocorrem, mudanças imunológicas também acontecem, sendo observadas maior infiltrado inflamatório, principalmente de macrófagos. Além de mudanças nos próprios adipócitos que passam a liberar para a corrente

sanguínea ácidos graxos livres, que por serem reconhecido pelos receptores do tipo toll (Toll Like Receptor 4) acabam por direcionar a resposta imune para um perfil pró inflamatório, proporcionando um microambiente rico em estresse oxidativo e radicais livres que podem ser associados a danos ao DNA e mutações (JUNG,2014; HEYN,2020).

A quantidade de adipócitos de um indivíduo é determinada na infância e adolescência e mesmo sob drásticas alterações no peso corporal está sujeito a poucas mudanças ao longo do tempo, com o aumento de volume do tecido adiposo na obesidade sendo maioritariamente definido pela hipertrofia (SPALDING, 2008).

O número de adipócitos presentes no tecido é determinado pelas células que são constitutivamente presentes e pela capacidade de se realizar o recrutamento de precursores, que se tornam adipócitos maduros e atuam no armazenamento lipídico. A hiperplasia é um processo dependente da disponibilidade de pré adipócitos e no caso do tecido adiposo de indivíduos magros, é capaz de dar origem a uma vasta quantidade de adipócitos afim de auxiliarem na renovação tecidual sem que ocorra o comprometimento da estocagem energética (DROLET,2008; DIVELLA,2016).

Entretanto, no caso do tecido adiposo obeso, o recrutamento acelerado leva ao esgotamento desses precursores o que compromete o desenvolvimento de novas células de gordura (TCHOUKALOVA, 2007). Dessa forma, a hipertrofia das células adiposas parece ser o principal responsável pela expansão do tecido adiposo na obesidade (JO, 2009).

A hipertrofia do tecido adiposo é uma adaptação a uma maior disponibilidade de triglicerídeos a serem armazenados. Esse processo, está associado a mudanças na matriz extracelular do tecido, como pouca presença de fibrose, que possui papel na regulação negativa na hipertrofia, visando sua limitação e manutenção da homeostase do tecido; e a baixa disponibilidade de pré adipócitos no tecido, limitando a possibilidade de geração de novas células. O aumento em relação ao volume dos adipócitos, está associada ao aumento do estresse celular, diminuição da flexibilidade metabólica e diabetes sistêmico, além do desenvolvimento de hipóxia (SUN, 2010; MUIR, 2016; DIVELLA,2016).

A obesidade é considerada uma condição de caráter inflamatório de baixo grau e crônica, caracterizada por alterações na homeostase do tecido adiposo. Devido ao papel dinâmico desse tecido, com ação pela liberação de moléculas que agem de maneira autócrina, parácrina e endócrina, o desequilíbrio de seu funcionamento pode alcançar efeitos sistêmicos, levando a condições como alterações nos níveis de glicose que podem levar ao aumento da resistência à insulina, alteração da diferenciação de pré-adipócitos, hipertrofia de adipócitos pré-existente, alterações nos perfis lipídicos, infiltração e polarização de macrófagos e liberação de citocinas inflamatórias (GREENBERG,2006; HEYN, 2020).

Dentre as diversas moléculas proveniente do tecido adiposo, temos a adiponectina, com função importante no aumento da sensibilidade a insulina pelo fígado e pelo músculo. Esta adipocina potencializa o processo de oxidação de ácidos graxos, inibe a ação do TNF- $\alpha$ , além de atuar potencializando a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (WELLEN, 2003, ODEGAARD, 2011).

Outro produto dos adipócitos a ser destacado é a leptina, esse hormônio tem sua ação no hipotálamo, onde induz o aumento do gasto energético e promove a saciedade, o que contribui com aspectos do peso corporal. No entanto, como essa substância é produzida pelo próprio tecido adiposo, o aumento dos níveis plasmáticos induz a resistência nas células alvo, como um processo de retroalimentação, já que ao mesmo tempo em que o excesso desse produto gera a resistência, a ausência dele também resulta em diferentes níveis de obesidade (GREENBERG,2006).

Além desse papel metabólico, a leptina atua ainda em respostas inflamatórias, devido ao seu papel quimioatraente, pelo recrutamento monócitos e macrófagos, além de regular positivamente os mecanismos de defesa contra infecções bacterianas, por exemplo, pelo aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ , IL-1ra, IL-10, MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  (ACEDO, 2013; FISCHER, 2019).

Em sinergia ao desbalanço hormonal, o remodelamento tecidual que ocorre na obesidade também influencia na liberação de fatores pró

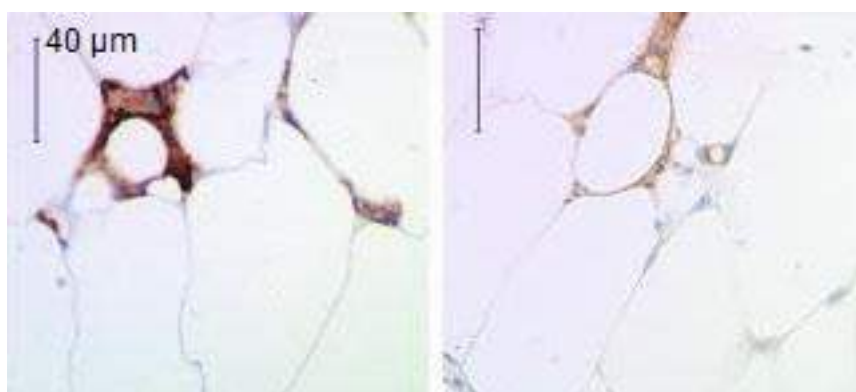
inflamatórios que passam a ser produzidos em maior quantidade, como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além de alterações em proteínas coagulantes (GREENBERG,2006; DE PERGOLA, 2002, XU 2003; KANG, 2016; OLEFSKY,2010).

Em conjunto, os fatores supracitados, agem em diversos tipos celulares como nas células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, recrutando-as para o tecido e instaurando o processo inflamatório crônico (GREENBERG,2006; KANG, 2016, DIVELLA, 2016).

## 2.4 RESPOSTA IMUNE

Uma parte considerável do tecido adiposo é formada por células imunes, que atuam promovendo a homeostase tecidual, entretanto o perfil de resposta dessas células está relacionado ao ambiente no qual elas estão inseridas. Dessa forma, um tecido adiposo desregulado acaba por liberar mediadores que recrutam e direcionam a resposta imune para o perfil pró inflamatório (KANG,2016; CORREA, 2019).

Em um tecido adiposo eutrófico, a célula imune encontrada em maior número são os macrófagos que participam do remodelamento homeostático, promovendo a eliminação de adipócitos mortos e de seus metabólitos, além de participar do processo de diferenciação de pré adipócitos (JUNG,2014). Entretanto, a medida em que o contexto da obesidade vai se estabelecendo, pelo crescimento em tamanho e em número de adipócitos, a atividade desses macrófagos se torna mais intensa, já que há um aumento no número de células em processo de morte, sendo possível se observar um aglomerado de macrófagos ao redor dos adipócitos formando estruturas similares a coroas (Figura 2). Isso ocorre ao mesmo tempo em que há o desbalanço na produção e liberação de citocinas e graças a sua plasticidade, o perfil das células imune é dependente do ambiente no qual estão inseridas (WEISBERG, 2003; MURANO, 2008; CHA,2018; HEYN,2020).



**Figura 2:** Estruturas em coroa. A estrutura em coroa formada por macrófagos que se acumulam ao redor de adipócitos foi descrita por Weisberg em 2003. A esquerda, tecido adiposo de animais submetidos ao modelo de obesidade induzido por dieta; a direita, tecido adiposo de animais *ob/ob*. Os macrófagos foram evidenciados por imuno-histoquímica para F4/80 ao redor dos adipócitos do tecido adiposo perigonadal de camundongos machos. Adaptado de Weisberg, 2003.



Os macrófagos representam uma parcela significativa do sistema imune, com grande papel efetor na imunidade. São células que se desenvolvem na medula óssea a partir de progenitor mielóide comum que passa por diversos estágios de diferenciação até serem liberados para a corrente sanguínea onde recebem o nome de monócitos, sob a forma de uma população heterogênea que ainda se encontra em estágio de maturação, pelo reconhecimento e ação de fatores de transcrição e receptores específicos (MOSSER, 2008).

Essas células circulam por quase todos os compartimentos teciduais, com a capacidade inclusive de se adentrarem ao tecido, passando por processos de maturação e transformando-se em macrófagos residentes, como forma de substituição de macrófagos teciduais senescentes, uma vez que esse tipo celular está presente constitutivamente e apresenta um papel importante na regulação, homeostase e vigilância imunológica de muitos órgãos e tecidos. (MOSSER, 2008; MARTINEZ, 2009; GORDON, 2010).

As células mononucleares fagocíticas possuem funções diversas, atuam na manutenção da homeostase, com papel na ciclagem de eritrócitos, na remoção de fragmentos celulares e células apoptóticas através da fagocitose e auxiliando no processo de remodelamento tecidual (KIM, 2005; ERWING, 2007; MOSSER, 2008; GORDON, 2018).

Por outro lado, através de seus receptores, macrófagos são capazes de reconhecer e responder tanto a componentes endógenos, como detritos celulares provenientes de trauma ou estresse, anticorpos, proteínas do complemento e de choque térmico, opsoninas, ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídios, quanto componentes microbianos. Esse reconhecimento pode resultar em fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, com consequentes cascatas de sinalização que levam a ativação gênica de com secreção de moléculas bioativas, alterações na migração, adesão celular e comunicação com as células da própria imunidade inata e da adquirida, que irão resultar na eliminação do patógeno ou célula anormal, ocorrendo o

remodelamento tecidual após esse processo (GORDON, 2003; MOSSER, 2008; GORDON, 2010).

Macrófagos apresentam grande diversidade morfológica e fenotípica de acordo com o órgão onde se encontram e sua condição de saúde ou doença. Essas células apresentam diferentes padrões de resposta de acordo com o estímulo que recebem no ambiente o qual estão inseridos, havendo, portanto, diferentes fenótipos de acordo com os tipos de genes que são ativados a partir dos estímulos disponíveis (STOUT, 2005; GORDON,2010).

Este tipo celular apresenta natureza plástica, sendo capaz de alterar suas características de maneira progressiva e reversível, de acordo com as características da matriz extracelular, moléculas de adesão e citocinas presentes, desenvolvendo variados tipos de resposta, como o aprimoramento da resposta imune, atividade antimicrobiana ou sua supressão (GORDON,2003; STOUT, 2005; MOSSER, 2008).

Embora seja bastante discutida a separação desse tipo celular em perfis antagônicos, sem que seja considerado padrões mistos ou intermediários de resposta, ainda se permanece utilizando a classificação em dois grandes perfis com base em sua ativação gênica: macrófagos ativados classicamente (M1) e alternativamente (M2), dentro dessa divisão ocorrem ainda subdivisões como M1a, M2a, M2b (MURRAY,2011).

O perfil M1 está relacionado a condições inflamatórias com alta capacidade microbicida e tumoricida. Caracterizado pela expressão de genes que se ativam após o reconhecimento dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP'S) ou Padrões Moleculares associados ao Dano (DAMP'S), realizados via receptores do tipo Toll, pela presença de Interferon Gama (IFN- $\gamma$ ) ou TNF- $\alpha$  no microambiente onde o macrófago se encontra. Quando ativados pela presença de LPS (Lipopolissacarídeos), essas células produzem mediadores como interferons (IFNs) tipo I, citocinas como as interleucinas IL-6, IL-8, IL -10, IL-12, IL-23 e quimiocinas como Ligante 8 de quimiocina de motivo C-X-C (CXCL8), ligante 3 de quimiocina, também conhecido como proteína inflamatória 1-alfa (MIP-1 $\alpha$  / CCL3), proteínas inflamatórias de macrófagos

(MIP-1 $\beta$ ) / CCL4) que agem de maneira autócrina e parácrina e participam do recrutamento de outras células como neutrófilos, células dendríticas, NK e linfócitos T para o local. Ocorre ainda a produção de citocinas pró inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  que sustentam esse microambiente inflamatório, resultando na ativação de fatores de transcrição como a STAT1, que em conjunto contribuem para eliminação do patógeno, mas que a longo prazo podem resultar em dano tecidual (MOSSER, 2008; MURRAY, 2011).

O desenvolvimento e manutenção desse perfil está relacionado a outras células do sistema imune inato, como as NKs, e do adquirido, como linfócitos T de perfil Th1, já que essas células são importantes fontes de IFN- $\gamma$  (MOSSER, 2008; MARTINEZ, 2009).

O perfil M2 está ligado a supressão do processo inflamatório, remodelamento tecidual e angiogênese e sua atividade está relacionada a presença de citocinas Th2 e a ativação de fatores de transcrição como o Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 6 (STAT6), IL-4, IL-10 e IL-13, possuem um papel importante no desenvolvimento desse perfil. IL-4 e a IL-13 compartilham os mesmos receptores e dessa forma apresentam efeitos similares, diferenciando-se uma da outra pela forma de sinalização e sua cinética (MARTINEZ, 2009; MURRAY, 2011).

As citocinas IL-4 e a IL-13 atuam inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e a IL-8, aumentam a expressão de moléculas de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) II, de receptores de manose, potencializam a pinocitose e endocitose, induzem produção de quimiocinas, como a quimiocina com motivo C-C 22(CCL22), inibem a função de Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOs) com aumento da atividade da Arginase (ARG) e aumentam a expressão de mediadores relacionado com o remodelamento tecidual (MARTINEZ, 2009). Embora também atue aumentando a atividade da ARG, a IL-10 atua de forma um pouco distinta, pois apresenta efeito variável na expressão dos receptores de manose e reduz a expressão de MHC II, além disso, essa citocina ativa o fator de transcrição Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e potencializa a ação do STAT6 (GORDON,2003; MURRAY, 2011).

Diversos tipos celulares são capazes de produzir essas citocinas, como linfócitos Th2, basófilos, mastócitos, eosinófilos e dessa forma, assim como ocorre no perfil M1, o perfil M2 também está relacionado a ação da imunidade inata e da adaptativa. Esse perfil também pode se desenvolver pela presença de complexos imunes, ação de agonistas de receptores do tipo Toll, imunossuppressores e glicocorticoides (GORDON,2009; MURRAY, 2011).

No tecido adiposo de indivíduos magros e saudáveis a população de macrófagos residentes se caracteriza pela presença de marcadores F4/80 + CD206 + CD301 + CD11c<sup>-</sup>, característicos de um perfil M2, com produção de poucas citocinas pró inflamatórias e predomínio da função da ARG em detrimento da ação da iNOs, com os macrófagos participando da manutenção da sensibilidade a insulina pelos adipócitos (LUMENG,2007; BOUTENS, 2018).

Com o estabelecimento da obesidade, os próprios adipócitos passam a produzir adipocinas específicas, como a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), que resulta em um maior acúmulo de macrófagos no tecido. Além do aumento no número de células, a presença de ácido graxos livres, liberados pelo tecido adiposo obeso, age como gatilho para ativação clássica de macrófagos, passando para o predomínio dessas células com os marcadores F4 / 80 + CD11c<sup>+</sup>, típicos do perfil M1, com intensa produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e produção de MCP-1 pelos próprios macrófagos, o que contribuem para a manutenção do processo inflamatório e continuidade do recrutamento de células (LUMENG, 2007; MOSSER, 2008; GORDON,2010; BOUTENS, 2018).

Essa rápida expansão tecidual não é acompanhada pelo processo de angiogênese e por isso, o tecido adiposo obeso é caracterizado por áreas de hipóxia, com a expressão aumentada de genes como o fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1- $\alpha$ ). A ativação desse fator de transcrição está relacionada a manutenção dos níveis de energia frente a alterações metabólicas, mas também atua na via de sinalização para a transcrição de IL-1 $\beta$ . Além disso a exposição prolongada a ambientes pobres em oxigênio pode contribuir com a

morte de adipócitos, com liberação de conteúdo extracelular, o que novamente contribui com a sustentação do fenótipo pro inflamatório (BOUTENS, 2018).

Esse tecido adiposo hipertrófico e inflamado se comunica de modo intenso e eficiente, seja com os próximos adipócitos, seja com células imunes que estão sendo recrutadas, como os macrófagos (LIANG,2017).

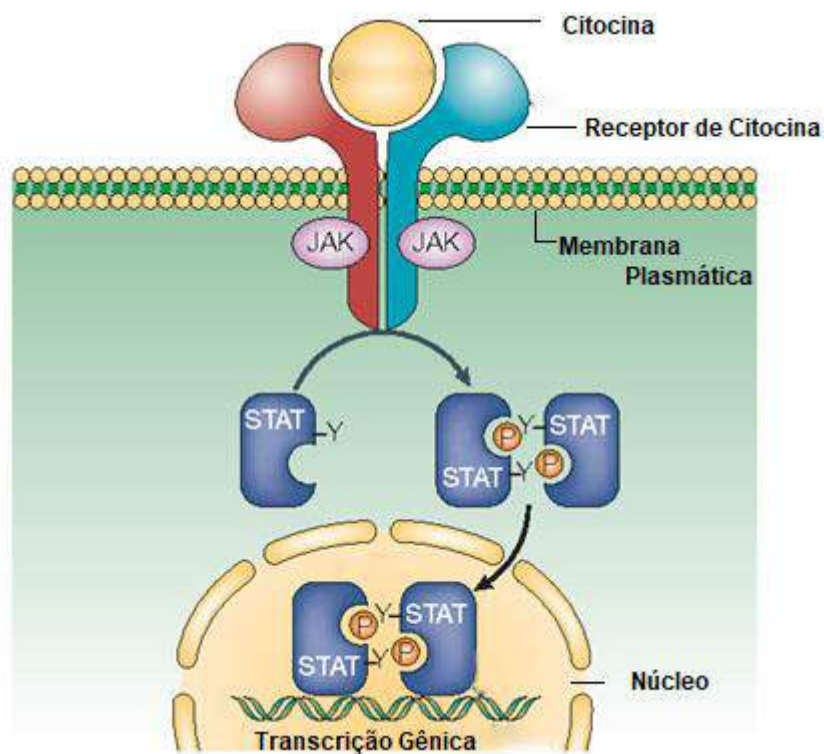
## **2.5 TRANSDUTORES DE SINAL E ATIVADORES DE TRANSCRIÇÃO (STATs)**

Como já mencionado, essa comunicação pode ocorrer via citocinas, quimiocinas, proteínas solúveis, e, mais recentemente, vem sendo destacado que essa função pode ser feita através de vesículas liberadas pelas próprias células, podendo apresentar ação local ou sistêmica (LIANG,2017).

A comunicação celular com o ambiente pode ocorrer via receptores de superfície que reconhecem moléculas específicas presente no meio externo. Esse reconhecimento resulta na transdução de sinais que regulatórios em vias de sinalização que atuam na regulação de processos como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e sobrevivência celular. Esse reconhecimento resulta na transdução de sinais em vias que atuam na regulação de processos como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e sobrevivência celular. Diversos estímulos induzem mudanças conformacionais em seus receptores e a consequente ativação de tirosinoquinasas, como as (JAKS), associadas aos receptores e presentes constitutivamente inativas no citoplasma. As JAKS participam da fosforilação de fatores de transcrição e transdutores de ativação (STATs) que por sua vez se translocam para porção nuclear e ativam a transcrição genica. O conjunto JAK/STAT tem papel fundamental em vários tipos de respostas celulares (SHUAI, 2003, IHLE et al., 2007) (Figura 3).

As proteínas STATs fazem parte de uma família de fatores de transcrição, os quais se ativam via presença de ligantes extracelulares específicos, como diversas citocinas e fatores de crescimento e desempenham papel fundamental na resposta imune. Os diferentes tipos de STATs são

fosforilados por estímulos variados e de acordo com cada um, um diferente perfil de resposta será gerado. Dessa forma, essas proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição são fatores essenciais na modulação de macrófagos (YANG, 2008, LI, 2018).



**Figura 3.** Esquema da via de sinalização JAK/STAT. O reconhecimento, via receptor específico, das moléculas de citocinas ativam as JAKs, que se fosforilam e mudam sua conformação, promovendo atividades catalíticas que promovem a fosforilação das STATs, que se dimerizam, translocando-se para o núcleo e dão continuidade a cascata de sinalização necessária para a transcrição gênica e consequente resposta ao estímulo.

As cascatas de sinalização dependente da ativação das STATs participam da processos regulatórios de genes relacionados a diferentes perfis de resposta. STAT1 e STAT2 são bem descritos como ativados por interferon, no qual a STAT1 promove a ativação de genes como o NOS2, relacionado a polarização de macrófagos M1 (induzida por IFN- $\gamma$ / LPS) (LI,2018). STAT1

também participa da ativação das vias das caspases, importante para mecanismos de morte celular programada como a apoptose (BOUSOIK, 2018).

A STAT3 é ativada por estímulos associados ao fenótipo de macrófagos M2 (IL-10, TGF- $\beta$ ) e devido a sua relação ao ator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) participa de processos de regulação de oncogenes, genes inflamatórios. Além disso, esse fator de transcrição está relacionado a aspectos de sobrevivência celular, como a expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e na regulação negativa de proteínas pró apoptóticas como a P53 (LI,2018, BOUSOIK, 2018).

A STAT4 por sua vez, participa de respostas a presença de citocinas pró inflamatórias, sendo ativada principalmente via receptor de IL-12, características de repostas imune do tipo Th1, e dessa forma, participa do direcionamento a esse perfil. Por sua vez, a STAT5 tem sua via ativada pela presença de IL-2 e está envolvida em processos de hematopoiese e proliferação de células T, além de participar de processos de sinalização no desenvolvimento de glândulas mamarias e da sinalização da prolactina (SHUAI,2003, BOUSOIK, 2018).

A ativação de IL-4R e IL-13R, resultam na transdução de sinal que ativam STAT6, com esse fator de transcrição sendo associado ao perfil Th2, sendo o principal fator de transcrição ativo em macrófagos M2, regulando diversos genes inflamatórios como a Arginase 1 (Arg1) (LAWRENCE, 2011, LI,2018).

A via de sinalização das STATs é relacionada a polarização de macrófagos. O balanço entre a ativação de STAT1 e STAT3 / STAT6, regula o direcionamento do perfil de resposta dessas células. O aumento na ativação de NF- $\kappa$ B e STAT1 direciona a polarização para M1, com ativação genica relacionadas a respostas citotóxicas e a produção de mediadores pró inflamatórios, com supregulacao de genes que codificam a iNOS (SICA, 2012, WANG, 2014). A polarização de macrófagos para o perfil M2 esta principalmente relacionada a fosforilação e ativação de STAT6. Por sua vez, a ativação desse fator de transcrição se relaciona a ativação e aumento da expressão de genes típicos como Arg1, receptores de manose e quimiocinas relacionadas a esse perfil (LAWRENCE, 2011, YU, 2019)

## 2.6 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares (VE's) são potentes ferramentas para a comunicação celular, carregando componentes variados até as células alvo, onde atuam no controle fisiológico para manutenção da homeostase. As células receptoras, ao receberem e internalizarem esse conteúdo, que pode ser dos mais variados tipos de biomoléculas como, proteínas, lipídios, açúcares e ácidos nucleicos, passarão por alterações que podem impactar tanto nas funções fisiológicas quanto patológicas (DENG,2019; YÁÑEZ-MÓ,2015; ZHAO,2017). As principais vesículas extracelulares descritas atualmente são classificadas em três classes: Corpos apoptóticos, Microvesículas e Exossomos (YÁÑEZ-MÓ,2015, STAHL,2019).

Os corpos apoptóticos são vesículas liberadas por bolhas ou brotamento na membrana, formadas pela atividade da actina e miosina na membrana plasmática, em células em processo de morte celular programada, com o diâmetro variando entre 50nm–2µm. Apresentam fosfatidilserina externalizada em sua membrana e seu conteúdo comumente possui fragmentos de organelas e material genético, com seus marcadores mais bem aceitos sendo a Anexina V, trombospondina e o C3b (GYÖRGY,2011; AKERS, 2013; ZABOROWSKI,2015).

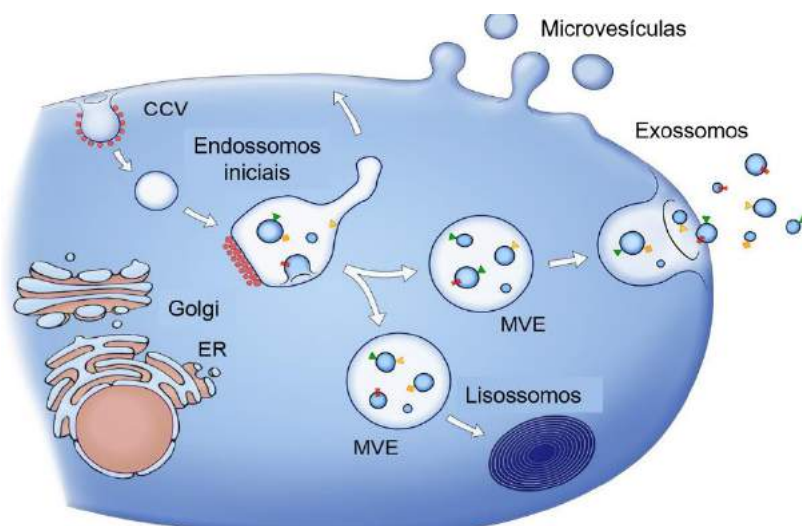
De modo similar, as microvesículas também formadas por brotamento e fissão na membrana plasmática (Figura 4), como resultado da redistribuição dos fosfolipídios de membrana e reorganização do citoesqueleto, apresentam a molécula de fosfatidilserina externalizada, no entanto, são liberadas fisiologicamente por células saudáveis. Apresentam tamanhos bastante variáveis, de 100 nm - 1µm e sua liberação para o ambiente está condicionada a diversos mecanismos, como por exemplo, ação de receptores e alterações nos canais de cálcio. Assim como os corpos apoptóticos, as microvesículas podem ser identificadas pela ligação a Anexina V, no entanto como este não é um marcador específico, outros critérios precisam ser utilizado em conjunto, como marcadores teciduais ou marcadores de superfície celular



como ARF6, VCAMP3 (GYÖRGY, 2011; AKERS, 2013; COLOMBO, 2014; ZABOROWSKI, 2015; YÁÑEZ-MÓ, 2015; STAHL, 2019).

As menores vesículas extracelulares já descritas são os exossomos, cujo tamanho pode variar de 30- 150 nm. Também são envoltos por membrana de bicamada lipídica e apresentam a fosfatidilserina externalizada, podendo ser identificado por marcação com Anexina V, no entanto, possuem marcadores específicos como CD63, CD81, CD 82, CD53, CD 37, CD9, LAMP1 e TSG101. A principal diferença dessa vesícula em comparação as outras duas está em sua biogênese (DENG, 2019; GYÖRGY, 2011; ARKERS, 2013; ZABOROWSKI, 2015; ZHAO, 2017) e devido a sua origem endossomal, essas vesículas também podem apresentar marcadores como RabGTPase, SNAREs, flotilina, Alix (RAPOSO, 2013).

A formação dos exossomos ocorre no interior do compartimento endossomal, região onde ocorre o endereçamento de vesículas e moléculas. Os endossomos iniciais se fundem com vesículas endocíticas que foram direcionadas a reciclagem, degradação ou liberação no meio extracelular (Fig.4). Em seguida, as moléculas destinadas a ciclagem, são separadas e o conteúdo restante pode ser observado sob a forma de pequenas vesículas, chamadas de corpos multivesiculares, presentes no lúmen endossomal, no interior dos endossomos tardios que podem ter dois destinos: serem degradados nos lisossomos ou liberados pela membrana plasmática, recebendo o nome de exossomos (ARKERS, 2013; COLOMBO, 2014; YÁÑEZ-MÓ, 2015).



**Figura 4:** Liberação e formação de microvesículas e exossomos. Microvesículas são liberadas para o meio extracelular pelo brotamento na membrana plasmática. Por outro lado, os exossomos são liberados pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática. Adaptado de Raposo, 2013.

Para que essas vesículas possam resultar alterações nas células receptoras, é necessário que ocorra a interação com a célula receptora ou que conteúdo seja internalizado, seja por meio da fagocitose, macropinocitose, fusão de membrana ou pelo reconhecimento de receptores com seus ligantes, sendo ainda discutido se essa internalização de conteúdo é um processo aleatório ou um direcionamento específico, já que este pode seguir por caminhos variáveis, podendo ser degradado, novamente secretado ou seu conteúdo pode interagir levando a mudanças na fisiologia celular (THÉRY, 2009; YÁÑEZ-MÓ, 2015; MATHIEU, 2019).

A quantidade e conteúdo de cada um desses três tipos de vesículas extracelulares é heterogêneo e variável de acordo com a célula de origem e sua condição fisiológica, no entanto, de modo geral, é comum a presença de proteínas de citoesqueleto, proteínas citosólicas, proteínas de tráfego de vesículas, enzimas, ácidos nucleicos. As propriedades bioquímicas e estruturais também são variáveis e dependentes do sítio extracelular função de cada vesícula (THÉRY, 2009; D- JONGO, 2012; ZABOROWSKI, 2015).

As vesículas extracelulares podem transportar diferentes tipos de ácidos nucleicos funcionais, como por exemplo RNA's mensageiros (mRNA), RNA não codificante, RNA transportador (tRNA), e regular a transcrição gênica a nível pós transcricional. O tipo e a função desse material estão relacionados a condição celular e parece desempenhar um papel de adaptação e sincronização do estado funcional celular, podendo ocorrer efeitos na angiogênese, hematopoiese, tumorigênese, com ação parácrina ou sistêmica (VALADI, 2007; LÖTVALL, 2014). As Microvesículas de adipócitos de ratos, carregam transcritos de proteínas associadas a biogênese de gotas lipídicas, adipocinase microRNA's (miRNA's) que participam da síntese lipídica

(MULLER, 2011). Enquanto, os exossomos derivados de tecido adiposo obeso de camundongos obesos possuem em seu interior miRNA-34a que age inibindo a polarização de macrófagos M2 através da regulação negativa de fatores de transcrição (PAN,2019). Além disso, a presença desses miRNA's tem um papel importante na modulação e função efetora em outras células imunes, podendo atuar aprimorando a sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígenos e células T, ou atuando no direcionamento dessas células para diferentes perfis (YÁÑEZ-MÓ, 2015).

No entanto, os exossomos secretados por macrófagos residentes no tecido adiposo polarizados para o perfil M1 podem liberar exossomos que carregam miRNA-155, que ao serem captados por células próximas pode suprimir a expressão de fatores de transcrição relacionados a sensibilidade a insulina. De mesmo modo, macrófagos de perfil M2 podem liberar exossomos contendo miRNA-223 que ao serem internalizados por adipócitos pode torná-los mais sensíveis a insulina (STAHL,2019).

Outro possível conteúdo presente nas vesículas extracelulares são as citocinas. Um estudo avaliou através em sistemas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* a relação entre citocinas e vesículas extracelulares, sendo analisadas trinta e três citocinas diferentes, foi demonstrado que a forma pela qual as citocinas eram liberadas, dentro de vesículas ou como moléculas solúveis, variavam de acordo com o sistema utilizado. Citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-22, IL-33, Eotaxina, ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C (IP-10), Fator Estimulador de Colônias 1 (M-CSF), ligante 9 de quimiocina (CXCL9), MIP-3 $\alpha$ , Fator de Crescimento Tumoral (TGF- $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  foram preferencialmente secretadas no interior de vesículas celulares nos três modelos avaliados, com a presença desses mediadores encapsuladas aumentado quando avaliadas em células estimuladas (FITZGERALD,2018).

O conteúdo diverso das vesículas extracelulares é bastante relacionado a resposta imune. Vesículas extracelulares produzidas por células dendríticas, diferenciadas a partir do sangue humano e estimuladas com LPS, são capazes de carregar moléculas de MHC-II, CD-40 e CD-83, importantes mensageiros imunológicos (OBREGON, 2009). Além do TNF- $\alpha$ , que ao serem entregues a células T podem resultar em sua ativação (OBREGON, 2009).

Microvesículas, provenientes de monócitos de linhagem celular humana previamente estimulados com LPS, possuem em seu interior a citocina IL-1 $\beta$ , além de componentes do inflamassoma como o domínio pirina da família NLR contendo 3 (NLRP3), que atuam promovendo a ativação de células endoteliais, e amplificando o processo inflamatório (WANG,2011).

Vesículas extracelulares produzidas por adipócitos diferenciados *in vitro* podem interagir de maneira autócrina no tecido, levando ao aumento na produção TNF- $\alpha$  e do MCSF pelos próprios adipócitos, além de agirem alterando a expressão gênica de macrófagos, supra regulando os genes responsáveis pela produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e monócito quimioatraente 1 (MCP-1), macrófago ativado e outras quimiocinas (WU, 2020). Exossomos liberados pelo tecido adiposo de camundongos obesos são carreadores de moléculas pró-inflamatórias que ao serem recebidas por macrófagos promovem sua ativação e migração, contribuindo para o processo inflamatório, sendo proposto que o contexto obeso altera a produção dessas vesículas o que por sua vez desregula a ação de certas proteínas e lipídios presentes nos exossomos (DENG, 2009).

Adipócitos de linhagem celular quando submetidos a stress se tornam hipertróficos e aumentam sua secreção de microvesículas, com essas vesículas sendo capazes de aumentar a migração de leucócitos tanto avaliados *in vitro* (macrófagos) quanto *in vivo* (monócitos e macrófagos) (EGUCHI, 2015). Macrófagos tratados com exossomos produzidos por células troncos derivadas do tecido adiposo sofreram aumento da presença de mRNA para ARG-1 e IL-10, típicos do perfil M2, o que indica que essas vesículas podem estar relacionadas a polarização celular, *in vitro*. Quando injetado em animais submetidos ao modelo de obesidade, os exossomos das células tronco do tecido adiposo inibiram a hipertrofia dos adipócitos ao mesmo tempo em que houve redução na produção de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6 e reprogramação dos macrófagos M1 para M2, demonstrando que os exossomos podem desempenhar um papel na modulação do processo inflamatório (ZHAO, 2017).

Diante do exposto, apesar de nos últimos anos o interesse pelo estudo de vesículas celulares e sua relevância nos processos de saúde doença

ter se tornado crescente, um maior entendimento a respeito desse mecanismo ainda é necessário. Como dados da literatura já demonstram, exossomos e microvesículas podem ter em seu interior moléculas capazes de imunomodular diversos tipos celulares e dessa forma, o estudo dessas vesículas secretadas pelo tecido adiposo podem auxiliar na compreensão do mecanismo pelo qual o estado inflamatório observado no tecido adiposo obeso se estabelece.

## **OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar exossomos derivados do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica e avaliar suas interações com macrófagos *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar exossomos do tecido adiposo perigonadal de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e dieta controle;

2. Caracterizar exossomos obtidas do tecido adiposo dos animais submetidos à dieta hiperlipídica e controle;

3. Avaliar como os exossomos do tecido adiposo dos animais obesos influenciam na polarização e na produção de mediadores inflamatórios em macrófagos murinos derivados da medula óssea, comparados ao tecido adiposo dos animais controle.

## **METODOLOGIA**



## 4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do presente estudo foi elaborado o seguinte desenho experimental (Fig.5).

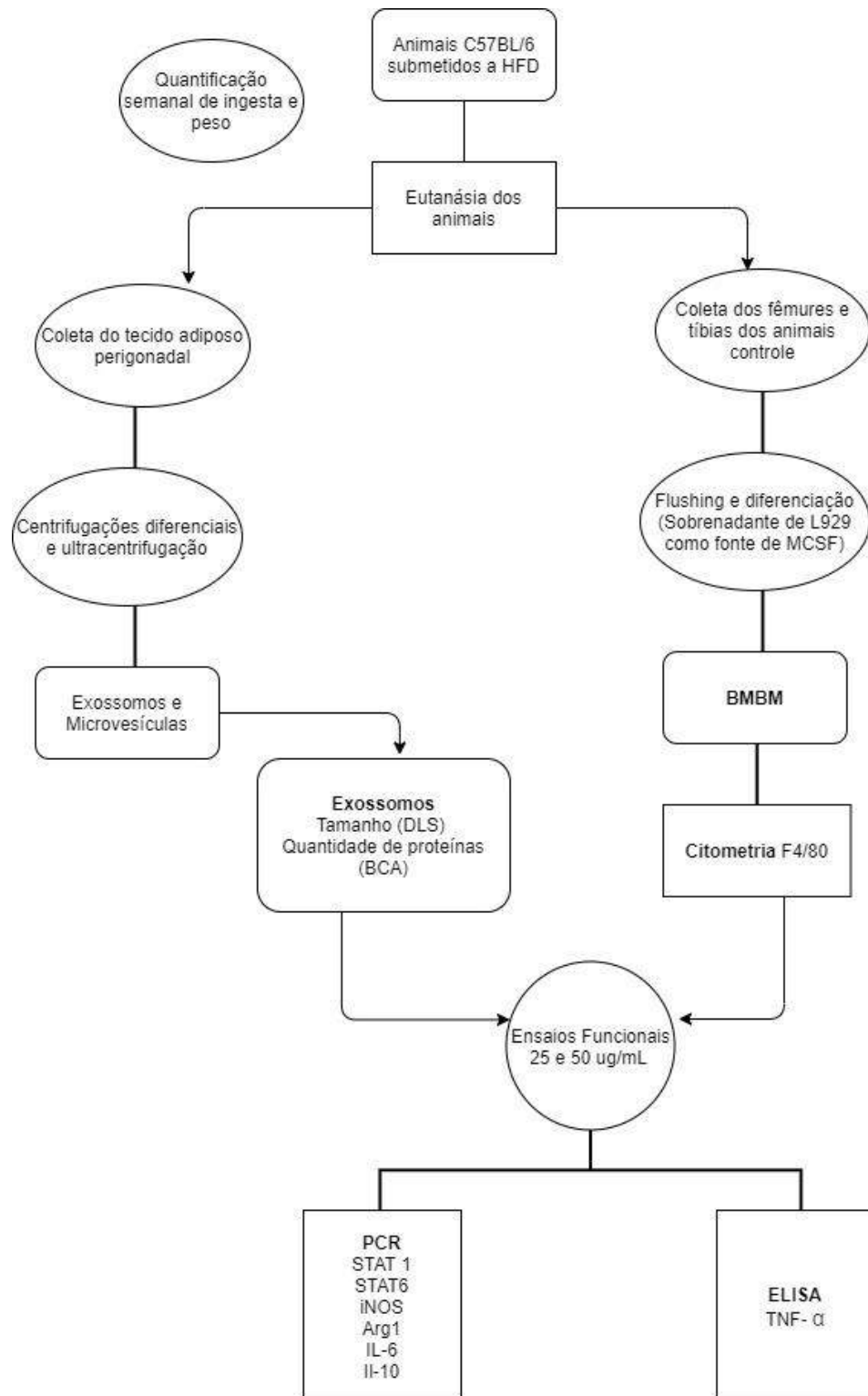


Figura 5. Desenho experimental.

#### 4.1 ANIMAIS

Para a realização dos ensaios, camundongos C57BL/6, machos e fêmeas, com 4-6 semanas de idade, obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram acondicionados em biotério climatizado, com temperatura e fotoperíodos controlados e livre acesso a água e ração. Como caráter preventivo, foi realizada a vermifugação dos animais com Ivermectina diluída em água por durante 7 dias.

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com o preconizado pelo Código Brasileiro para Utilização de Animais de Laboratório, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFJF, sob número 038/2019.

#### 4.2 MODELO DE OBESIDADE

Após a definição dos grupos experimentais, ao longo de 12 semanas foram observadas às alterações de peso e médias de ingestão dos animais.

Para o grupo submetido ao modelo de obesidade, foi ofertada a dieta hiperlipídica (HFD), produzida no laboratório e adaptada de Maioli *et al* (2016), de modo a garantir que o aporte calórico fosse baseado em 60% de gordura, enquanto os demais nutrientes fossem equivalentes ao da dieta padrão (Tabela 1). Para a produção de 1 kg de ração, cada ingrediente listado abaixo foi pesado e homogeneizado em multiprocessador, com a massa resultante sendo colocada em recipientes e mantida congelada a -20°C até o momento da oferta. Os animais do grupo controle foram alimentados com ração comercial padrão da Nuvilab.

Após as 12 semanas, os animais foram eutanasiados para coleta do tecido adiposo perigonadal de ambos os grupos, assim como fêmures e tíbias do grupo controle para a obtenção de macrófagos.

**Tabela 1:** Ingredientes utilizados para o preparo de 1kg de ração hiperlipídica.

<i>Ingrediente</i>	<i>Peso (g)</i>
<i>Caseína</i>	<i>200</i>
<i>Sacarose</i>	<i>100</i>
<i>Amido de milho</i>	<i>115,5</i>
<i>Amido Dextrinizado</i>	<i>132</i>
<i>Banha</i>	<i>315</i>
<i>Óleo de soja</i>	<i>40</i>
<i>Celulose</i>	<i>50</i>
<i>Mistura de minerais AIN-93</i>	<i>35</i>
<i>Mistura de vitaminas AIN-93</i>	<i>10</i>
<i>L- Cistina</i>	<i>3</i>
<i>Bitartarato de Colina</i>	<i>2,5</i>

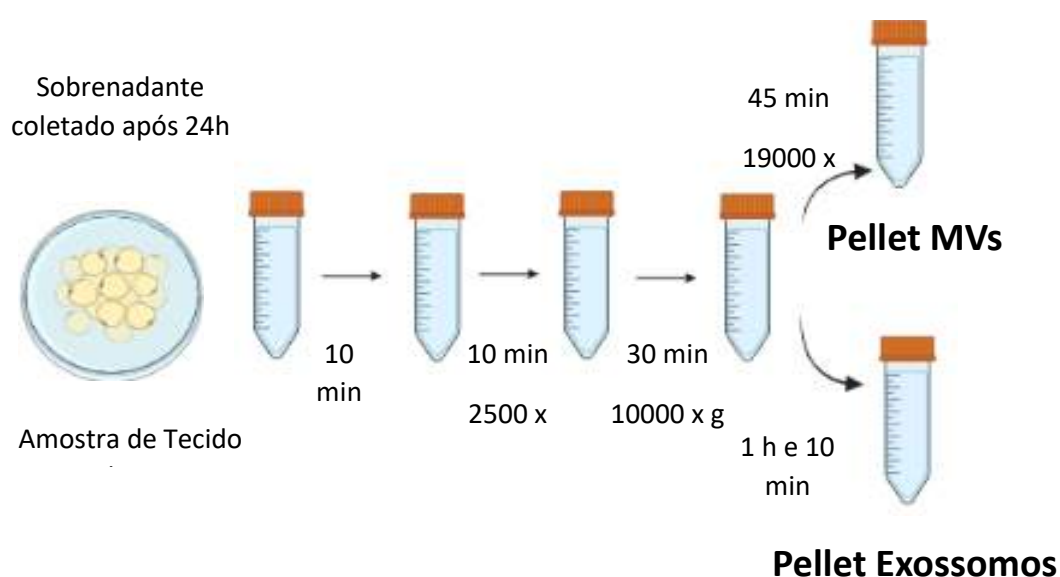
### 4.3 OBTENÇÃO DOS EXOSSOMOS

O tecido adiposo coletado, em ambiente estéril, foi acondicionado em tubo falcon estéril contendo 1% de antibiótico 100 UI/mL (penicilina e estreptomicina) para pesagem. Posteriormente, adicionou-se solução tampão de fosfato (PBS) 1x para lavagem das amostras, realizando centrifugações de baixa rotação para remoção de impurezas e de células sanguíneas. Em seguida, o material foi picotado em porções milimétricas e distribuído em placas de cultura de seis poços, contendo meio de cultura DMEM High Glucose (Gibco®) suplementado com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e incubado por 24 horas em estufa de cultura a 5% de CO<sub>2</sub>, adaptado de FERRANTE *et al* (2015).

Para obtenção dos exossomos, o sobrenadante coletado foi submetido a uma série de centrifugações e ultracentrifugações, de acordo com o protocolo adaptado de Gurunathan (2019), Kranendonk (2014) e Théry (2006): 10 minutos a 400 xg, para remoção de corpos apoptóticos; 2500 xg por 10 minutos para remoção de debris celulares; 45 minutos de centrifugação a 19000 xg, no qual haverá a formação de pellet contendo microvesículas. A

fração de microvesículas foi ressuspensa em PBS 1x, novamente centrifugada a 19000 xg por 45 minutos. A fração restante foi filtrada em milipore de 0,22  $\mu\text{m}$  e submetida à ultracentrifugação de 100000 xg por mais 1 hora e 10 minutos a partir da qual foi obtido o pellet contendo os exossomos, que foi ressuspensa em PBS 1x e novamente ultracentrifugado a 100000 xg por mais 1 hora e 10 minutos (Fig.6).

As microvesículas e exossomos obtidos foram aliqotados e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises e ensaios posteriores.



**Figura 6:** Esquema do protocolo de obtenção de vesículas extracelulares. Para a obtenção das amostras, após o processamento, as amostras de tecido foram mantidas em cultura por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e submetido a série de centrifugações e ultracentrifugações. Após a obtenção do pellet contendo as microvesículas (MVs) ou exossomos (Exos), o tubo foi novamente centrifugado e ultracentrifugado, respectivamente, para lavagem de todo o meio de cultura que pudesse ter ficado presente na amostra.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

### 4.4.1 Tamanho dos exossomos

Com relação ao tamanho, os exossomos foram caracterizados, utilizando a técnica do espalhamento de luz dinâmico (DLS) através do

equipamento no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da UFJF.

Para tal, 50 mL de amostra que estavam acondicionadas em PBS 1x, tiveram seu volume reajustado para 1 mL, sendo filtradas para a remoção de possíveis cristais, levadas ao vórtex para homogeneização e, em seguidas, transferidas para cubetas de quartzo (ZEN2112) para leitura no equipamento.

#### **4.4.2 Quantificação proteica**

Para quantificação total do conteúdo proteico dos exossomos e das microvesículas foi utilizado o kit de dosagem de proteínas Micro BCA™ ProteinAssay (ThermoScientific™ Pierce™), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

### **4.5 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMs)**

#### **4.5.1 Cultura de Células L929**

A linhagem de fibroblastos provenientes de tecido conjuntivo de camundongos L9292 (NCTC clone 929 [L cell, L929, derivative of Strain L] (ATCC® CCL-1™) secreta para o meio extracelular o fator estimulador de colônias MCSF (GERSUK, 2004) e por isso o sobrenadante dessas células foi utilizado como fonte dessa citocina.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina (1%) em garrafas de cultura e mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cada dois dias as células foram lavadas com PBS 1x estéril e o meio de cultivo substituído por meio novo, até chegar a aproximadamente 80% de confluência. Após atingir essa porcentagem, o sobrenadante foi coletado em tubo Falcon, centrifugado

10 minutos a 1500 rpm para remoção de debris e restos celulares, acondicionado em um novo tubo e conservado a -20°C até o momento do uso.

#### 4.5.2 Isolamento das células da medula óssea e obtenção dos macrófagos

Os membros inferiores dos camundongos controle foram coletados em fluxo laminar e dissecados para o isolamento do fêmur e da tíbia, sendo acondicionados em PBS 1x estéril e gelado até o momento da realização do flushing. Com o auxílio de tesouras e pinças as epífises dos ossos foram removidas, utilizando seringa e agulha de insulina para a lavagem com 10 mL de PBS 1x gelado, até que fosse observado que o osso estivesse transparente e toda a medula óssea fosse removida. A suspensão de células foi passada pelo cellstrainer de 70  $\mu\text{m}$  e com o auxílio do embolo da seringa os possíveis pedaços da medula foram macerados, sendo posteriormente, centrifugada por 10 minutos a 400 xg em temperatura ambiente, com o sobrenadante sendo descartado e o pellet ressuspendido em meio RPMI (Gibco®), contendo 10% SFB, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 15% de sobrenadante de L929, utilizado como fonte de MCS-F necessário para a diferenciação em macrófagos. Com a concentração ajustada para  $4 \times 10^6$  células por mL, foi plaqueado 10 mL da solução de células com o meio completo em placas de petri que foram incubadas em estufa controlada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. No terceiro dia, 10 mL de meio RPMI foi repostado, mantendo a concentração 10% SFB, 1% (penicilina e estreptomicina) e 15% de sobrenadante de L929 (adaptado de ZHANG *et al*, 2008 e FRANCKE *et al*, 2011).

Ao final de sete dias do protocolo de diferenciação, as placas de Petri contendo os macrófagos derivados da medula óssea, tiveram seu sobrenadante coletado e foram colocadas no gelo. Em seguida, foi adicionado 5 mL de PBS 1x estéril, bem gelado, e com o auxílio de Cell Scraper a placa foi raspada para auxiliar no descolamento das células. A suspensão células foi então recolhido e transferido para um tubo tipo falcon de 15 mL e o procedimento repetido por três vezes. A solução de células foi centrifugada 10

minutos, 4°C, 1500 rpm e ressuspendido em meio 5 mL de RPMI com 10% SFB, 1% de antibiótico.

Todos os ensaios foram realizados em placas de cultura de 24 poços, sendo usada a concentração  $4 \times 10^5$  células por poço em um volume de 0,5 mL de meio RPMI suplementado.

#### 4.5.3 Caracterização dos macrófagos

Para avaliar se o processo de diferenciação foi eficaz na obtenção de BMDMs foi analisada a presença de F4/80, uma glicoproteína, constitutivamente expressa e considerada um marcador de superfície específico para macrófagos murinos.

Após a coleta do sobrenadante, conforme descrito no item anterior, a suspensão de células em PBS foi centrifugada por 10 minutos, 4°C, 400 g. No pellet de células ressuspendido em tampão de FACS (PBS com 1% de SFB), foi adicionado 1 µL do anticorpo anti F4/80 (FITC), com a solução incubada em geladeira e protegida da luz por 40 minutos.

Após o período de marcação, a suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos, 4°C, 400 g e ressuspendida em 300 µL de tampão FACS. As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo FACScanto (Becton&Dickinson) com 30.000 eventos adquiridos e definidas com base no tamanho versus granulosidade (FSC x SSC) e na granulosidade por intensidade de fluorescência (FL1-H).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO DOS EXOSSOMOS

Baseado em dados bibliográficos e nas dosagens de quantidade de proteínas através do kit BCA, foi estabelecida a concentração de trabalho de 25 e 50 µg/mL para os ensaios utilizando os exossomos.

Para avaliar o perfil de transcrição gênica em células tratadas com os exossomos foram utilizados BMDMs nas seguintes condições: estimulados com os exossomos de tecido adiposo dos animais obesos nas concentrações 25 e 50 µg/mL; estimulados com os exossomos de tecido adiposo dos animais controle nas concentrações 25 e 50 µg/mL e não estimulados.

## **4.7 PCR EM TEMPO REAL**

### **4.7.1 Extração de RNA**

Após a coleta do sobrenadante para os demais ensaios, as células foram lavadas com PBS estéril, e em seguida, adicionado 0,5 mL de Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA) por poço, realizando movimentos de *up-down*. Essa solução de células, foi transferida para um eppendorf e armazenada por pelo menos 24h a -80 °C.

Após descongelamento em gelo, adicionou-se 200 µL de clorofórmio ao eppendorf, sendo a solução incubada por 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos para separação das amostras em três fases distintas.

O RNA presente na fase aquosa superior foi coletado e transferido para outro eppendorf, sendo adicionado 500 µL de isopropanol em seguida, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 12.000 rpm a 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com etanol 75%. Após as lavagens, os eppendorfs foram deixados invertidos sobre papel toalha com a tampa aberta, para evaporação do etanol. Após a secagem foi adicionado 30 µL de água RNase free e em seguida armazenados em freezer -80°C.



#### 4.7.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A absorvância das amostras de RNA foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific), para avaliar a qualidade e para quantificação do material genético das amostras. As dosagens foram feitas a partir de 2 µL da amostra e a quantidade de RNA foi padronizada.

A síntese de cDNA foi realizada pela técnica de transcrição reversa (RT), a partir das fitas de mRNA. A síntese foi realizada em tubos nuclease-free, utilizando-se os seguintes reagentes: enzima Transcriptase Reversa (AppliedBiosystems) (1 µL), dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) (0,8µL), random primers (2 µL), RT buffer (2 µL) e H<sub>2</sub>O RNasefree (4,2 µL). Os tubos foram levados ao termociclador nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, com a temperatura final do ciclo chegando a 4°C.

O cDNA sintetizado foi diluído na proporção 1:2 em água extra pura e armazenados a -20°C até o momento do uso.

#### 4.7.3 Avaliação da expressão dos mRNAs

Após a síntese do cDNA, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Com iniciadores (5`-3`) utilizados para análise da expressão de mRNAs específicos conforme descrito na tabela abaixo (Tab.2). O gene de referência utilizado foi a beta-actina.

Para a reação de real time PCR os cDNAs foram diluídos 1:2 em água extra pura. As reações foram feitas no volume final de 20 µL, dos quais 5 µL de amostra cDNA e 15 µL da solução contendo 10µL Syber Green Master Mix (Applied Biosystems), primers Foward (0,4 µL) e reverse (0,4 µL) de cada gene, na concentração de 10 µM e água extra pura (4,2 µL). O ensaio de Real-time PCR foi realizado equipamento Step One Plus Real-time RT-PCR System, utilizando-se as seguintes condições: Desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos 95°C por 15 segundos para desnaturação, seguido do

anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Cada amostra foi feita triplicatas biológicas, usando triplicatas de poços. Como controle negativo para a reação de real-time PCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers e água ultrapura.

A análise das curvas de melting e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise da expressão gênica através de Real-time PCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Esse método utiliza o *threshold cycle* (CT), que é o número de ciclos em que a fluorescência ultrapassa o limiar, *threshold*, ou seja, onde há aumento significativo na emissão de fluorescência. Calculou-se inicialmente o  $\Delta Ct$  de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT do gene controle ( $\beta$ - actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do  $\Delta Ct$  da amostra. Para o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  utilizou-se a fórmula seguinte: [ $\Delta Ct$  (amostra) –  $\Delta Ct$  (amostra controle)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta Ct$ , aplicou-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa.

**Tabela 2** :Primers a serem utilizados para a realizados para a avaliação dos perfis dos macrófagos tratados com os exossomos.

PRIMERS		
	Foward (5' --> 3')	Reverse (3' --> 5')
Arg-1	CCTGCTTTCCTCTCCTTTCTC	GTTTCCTGGCCTACACATTTTC
iNOS	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	CGTTTCGGGATCTGAATGTGA
STAT 1	GGATCGCTTGCCCAACTCT	TGCAGGTTCCGGGATTCAACA
STAT 6	CATCAGCACCTTGGAGAGCA	AGGACCATTGACAGGAGGGT
IL-6	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
IL-10	GATGCCCCAGGCAGAGAA	CACCCAGGGAATTCAAATGC
IL-4	GTCCCCTCCCCTACTACAAATG	ATCCCCTAGCTATCCCCTAG
TNF- $\alpha$	CTACTTTGGAGTCATTGCTCTGTG	CCAGCATCTTGTGTTTCTGAGTAG
$\beta$ -actina	CCACCATGTACCCAGGCATT	CCACCATGTACCCAGGCATT

#### **4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS**

Para determinar como os exossomos influenciam na produção de citocinas, foi coletado os sobrenadantes de macrófagos derivados da medula óssea não estimulados ou estimulados com diferentes condições de exossomos. Os sobrenadantes coletados foram avaliados quanto à presença da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, utilizando a metodologia proposta no kit comercial.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

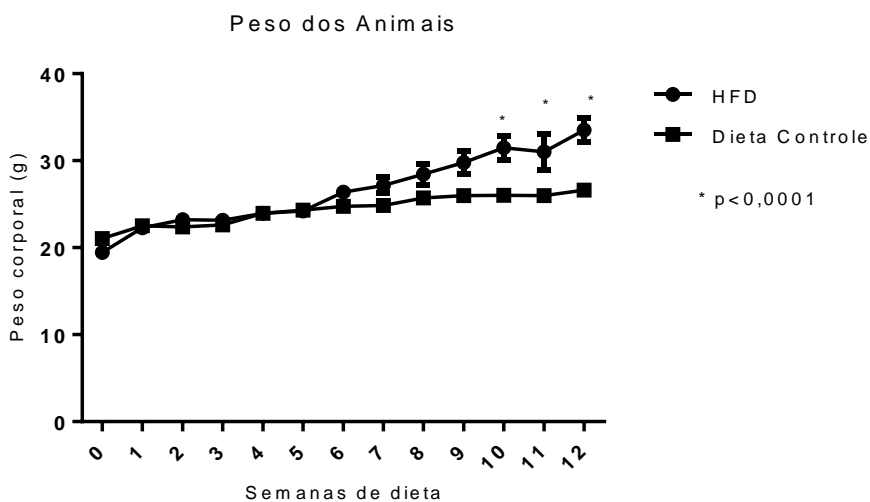
A análise estatística dos dados foi avaliada através do GraphPadPrism 6.0 (software). Os resultados são expressos em função da média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância ANOVA com pós teste de Bonferroni ou Teste T de Student. Foi considerada como significativa às análises estatísticas que apontaram  $p < 0,001$ . Para análise estatística da dosagem de citocinas foi realizada a comparação entre os grupos através da análise de variância one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

## **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

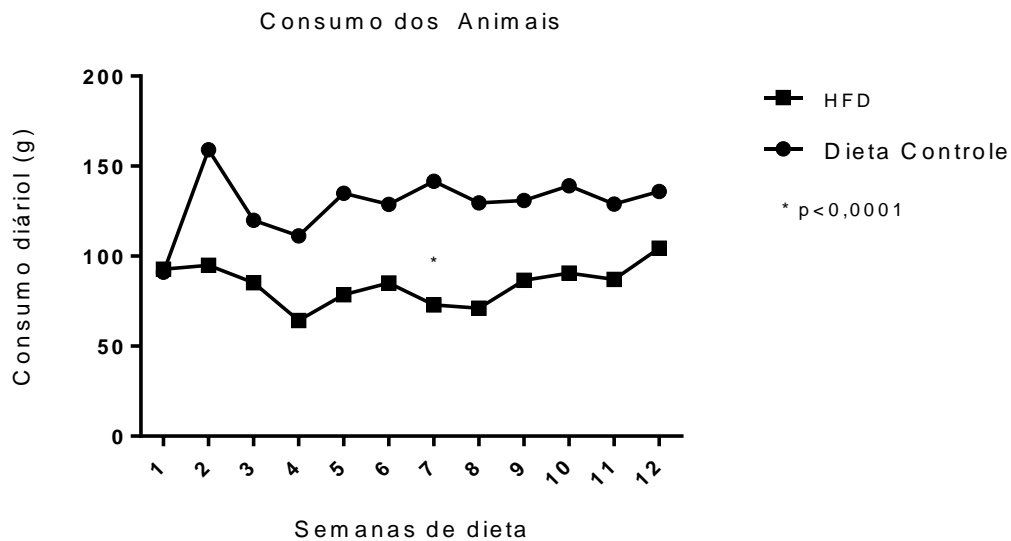
### 5.1 MODELO DE OBESIDADE

O peso dos animais de ambos os grupos foi acompanhado semanalmente, com aumento significativo no peso dos animais do grupo que recebeu a dieta hiperlípica a partir da nona semana, conforme é possível observar no gráfico abaixo (Fig. 7).



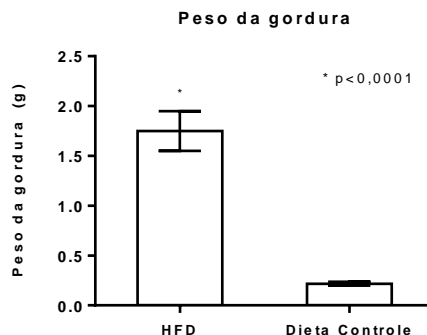
**Figura 7:** Peso corporal dos camundongos C57BL/6. Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (n=6) apresentaram aumento de peso corporal, com diferença significativa, em relação ao grupo de animais alimentados com a dieta padrão (n=6), a partir da semana 9. O asterisco representa diferença estatística em teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste Bonferroni ( $p < 0,001$ ).

Foi observado que o aumento de peso corporal não havia relação com a hiperfagia, já que os animais do grupo HFD tinham menor consumo de ração desde a primeira semana quando comparados aos camundongos alimentados com a dieta padrão (Figura 7).



**Figura 8:** Consumo de ração por gaiola ao longo das semanas. Houve diferença significativa na ingesta entre o grupo alimentado com a HFD e o grupo tratado com a dieta controle na semana 7. Os grupos foram divididos em duas gaiolas, cada uma com seis camundongos C57BL/6. O asterisco representa diferença estatística em teste Two-way ANOVA, seguido do pós teste Bonferroni ( $p < 0,001$ ).

Também foi quantificado o peso das gorduras perigonadais coletadas para esse estudo. Como esperado, foi observado que os animais submetidos à HFD apresentaram aumento significativo no peso da gordura quando comparados ao grupo controle, sendo este um indicativo do desenvolvimento de obesidade nesses animais (Figura 8).



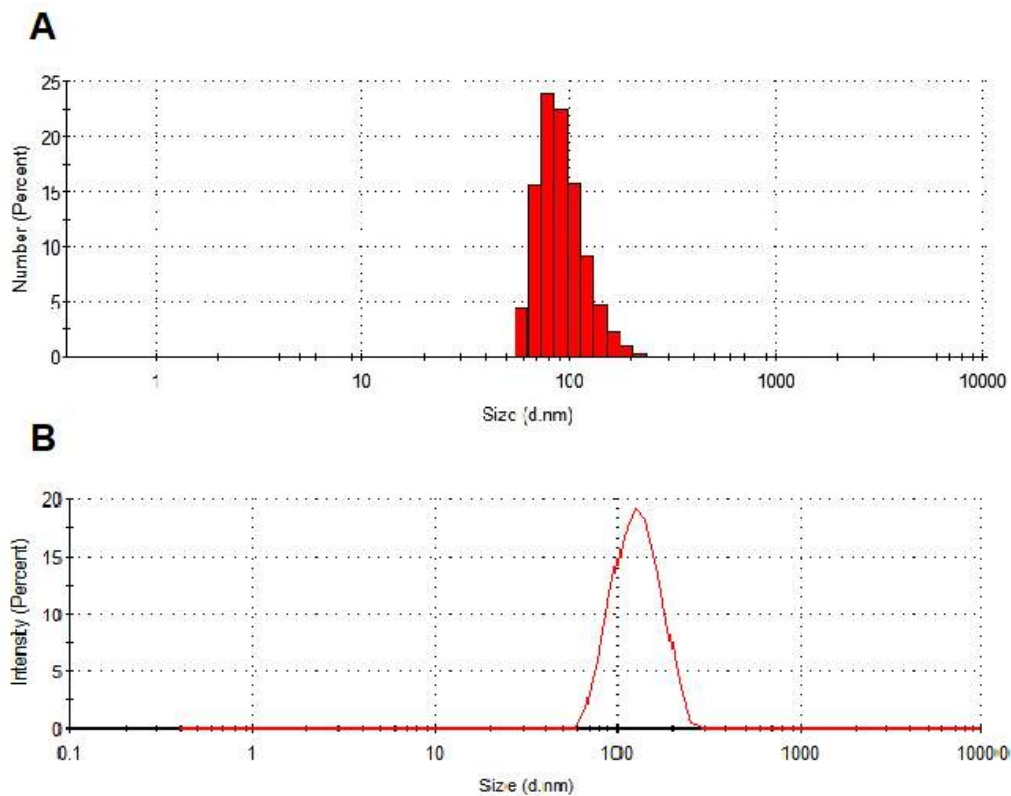
**Figura 9:** Peso da gordura perigonadal dos animais. Após a eutanásia dos animais o material foi coletado e pesado em balança analítica. Houve diferença significativa entre o peso da gordura perigonadal do grupo alimentado com a HFD quando comparado ao grupo que recebeu a dieta controle. Os grupos foram divididos em duas gaiolas, cada uma com seis camundongos C57BL/6. O asterisco representa diferença estatística em teste T de Student ( $p < 0,001$ ).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

### 5.2.1 Tamanho dos exossomos

Após o processamento o tecido adiposo (T.A) perigonadal foi mantido em cultura por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi então coletado e submetido à centrifugação diferencial para a obtenção das microvesículas e posteriormente ultracentrifugado para a obtenção dos exossomos.

As amostras acondicionadas em PBS, após serem homogeneizadas foram então caracterizadas quanto ao tamanho pela técnica do espalhamento dinâmico da luz (DLS). Foi observado o tamanho médio das partículas de  $131 \pm 36$  nm, com a maioria das partículas, (19,1%), medindo em torno de 122,4 nm (Figura 10).



**Figura 10:** Tamanho dos Exossomos. Após a coleta e processamento das amostras, o tamanho foi avaliado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS. A análise nesse equipamento revelou que o maior percentual dessas vesículas interceptadas pelo laser estava distribuído tinham o tamanho de  $131 \pm 36$  nm.

### 5.2.2 Quantidade de proteína

Para determinar as concentrações dos ensaios funcionais, após a lise das amostras foi realizada a dosagem de proteína através do kit de BCA (Tabela 3). Foram obtidos os seguintes valores médios de concentração proteica:

**Tabela 3:** Concentração de proteína encontrada nas vesículas extracelulares.

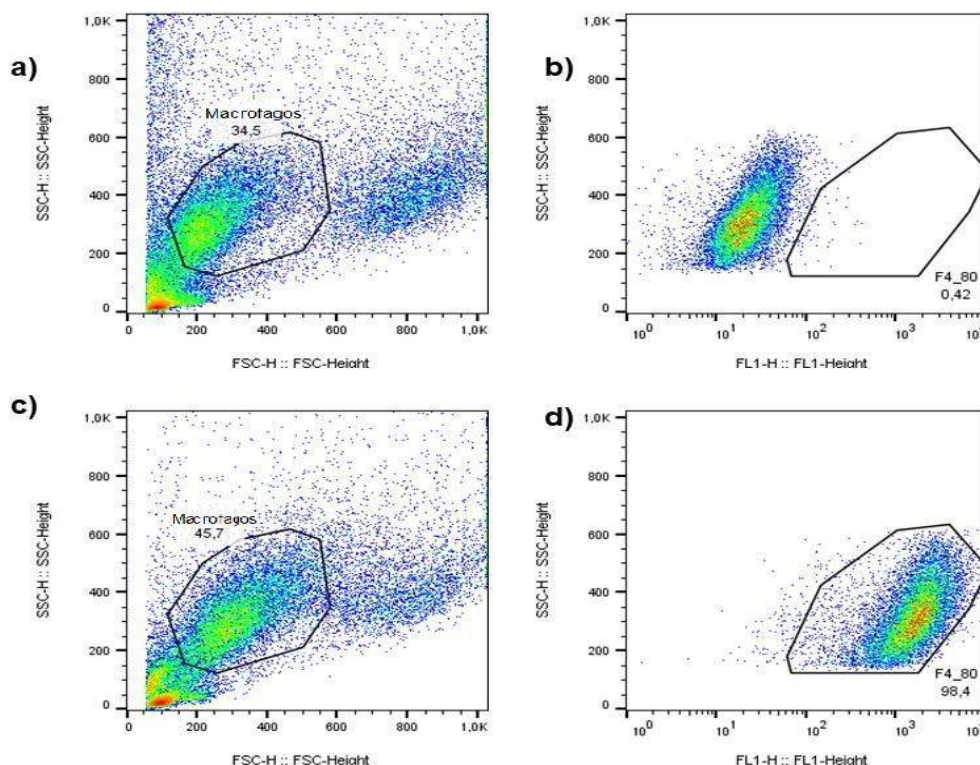
	Controle	Obeso
Exossomos	2,831,405 ug/mL	2732,4 ug/mL
Microvesícula	1816,56 ug/mL	3,944,411 ug/mL



### 5.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA

Para confirmar a efetividade do processo de diferenciação das células provenientes da medula óssea em macrófagos, ao final dos sete dias do processo as células foram avaliadas através de citometria de fluxo quanto à presença do marcador F4/80, sendo essa uma glicoproteína bem estabelecida como um marcador específico de macrófagos murinos. Após a marcação com o anticorpo, as amostras foram adquiridas em citometro de fluxo, gerando os gráficos conforme apresentado abaixo (Fig.9).

Da população analisada, cerca de 34,5% (Figura 9A) podem ser considerados macrófagos, com base em seu tamanho e granulosidade, e destes, cerca de 98,4% se mostraram positivos para a marcação com o F4/80 (Figura 9D).



**Figura 11:** Citometria de fluxo F4/80. Visualização de granulosidade (SSC) por intensidade de fluorescência de células derivadas da medula óssea de camundongo C57BL/6. Em (a) e (b) as células não marcadas, com o delineamento dos gates esperadas para população. Em (c) e (d) as células marcadas com o F4/80 (FITC). As análises foram realizadas no software FlowJo 10.7.1.

#### 5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM EXOSSOMOS DO TECIDO ADIPOSE

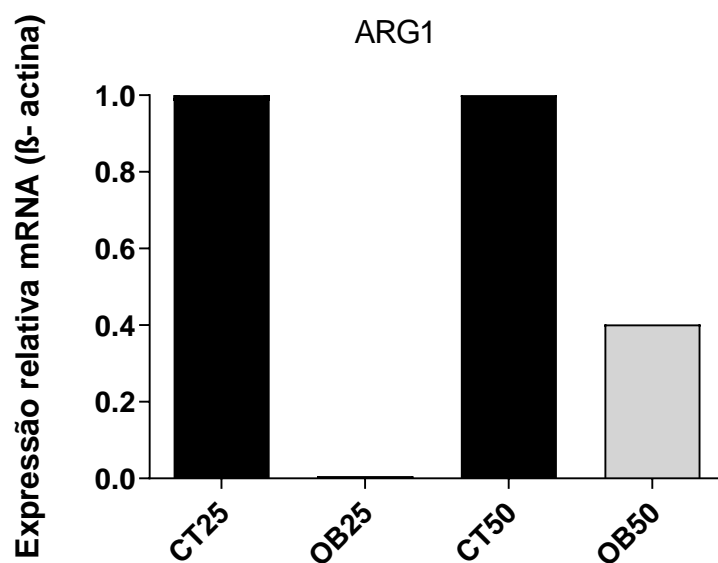
Após a extração e conversação do RNA em cDNA dos macrófagos derivados da medula óssea tratados com as diferentes concentrações de exossomos do tecido adiposo dos animais obesos e controle foi realizada a técnica RT PCR.

Utilizando-se a quantificação relativa, os dados obtidos foram apresentados em relação a um gene controle endógeno,  $\beta$ - actina. A presença desse gene controle é fundamental para corrigir variações em passos anteriores à amplificação.

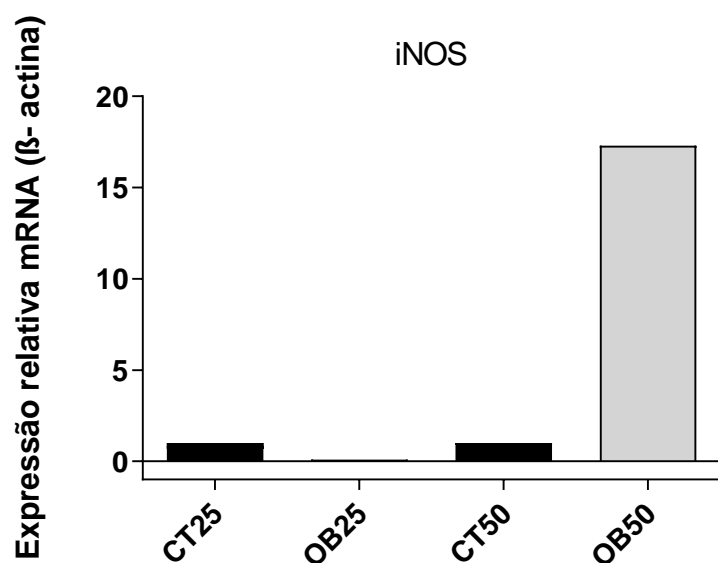
A expressão gênica relativa dos genes avaliados foi calculada com base no método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , comparando o tratamento com exossomos do tecido adiposo obeso com o tratamento na mesma concentração com os exossomos do tecido adiposo controle.

Os dados obtidos são interpretados como a expressão do gene de interesse em macrófagos tratados com os exossomos do tecido adiposo obeso em comparação à expressão genica dos macrófagos tratados com os exossomos do tecido adiposo controle.

Com relação à Arginase 1, foi observado que o tratamento com exossomos de T.A obeso reduziu sua expressão. A menor concentração (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduziu a expressão dessa enzima a valores próximos de zero (0,006), enquanto a maior concentração (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), manteve sua expressão em valores próximos a metade (0,40) do observado na mesma concentração no tratamento com exossomos do T.A controle (Figura 12). Para a enzima óxido nítrico-sintase induzida, também foi observado que a menor concentração de exossomos reduziu a expressão para níveis próximos de zero (0,09), entretanto, a maior concentração levou a superexpressão desse gene (17,3) (Figura 13).

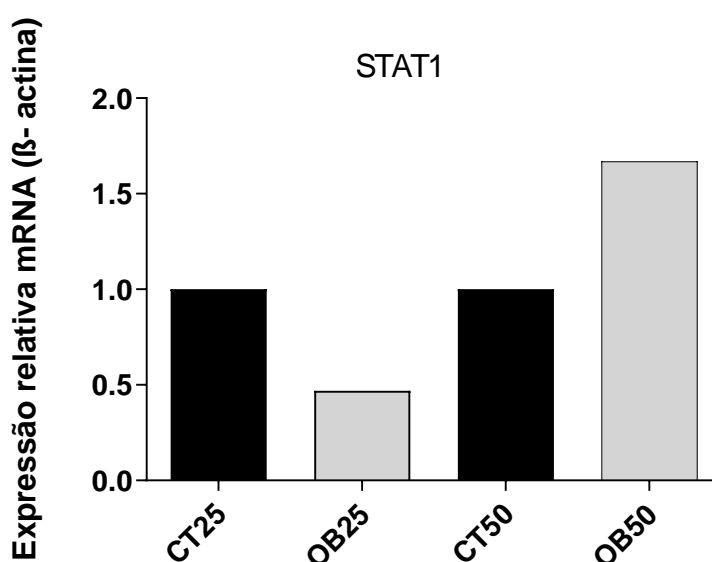


**Figura 12:** Mudança no nível de expressão do gene Arginase1. BMDMs foram tratados com 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de exossomos do tecido adiposo obeso e controle por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.



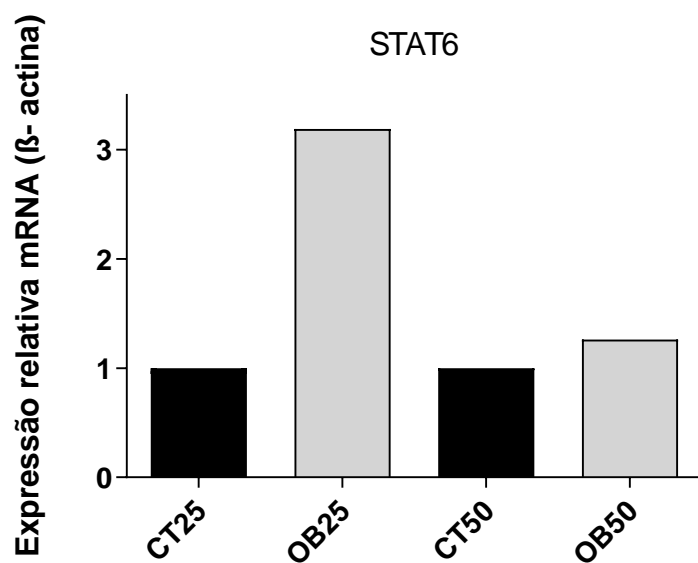
**Figura 13:** Mudança no nível de expressão do gene Óxido nítrico sintase. BMDM foram tratados com 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de exossomos do tecido adiposo obeso e não obeso por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.

Para o fator de transcrição, STAT1 foi observado que, em comparação ao tratamento com exossomos do T.A controle, a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a expressão desse fator praticamente pela metade (0,47) (Fig. 14). Entretanto, essa mesma concentração induziu a expressão de STAT6 cerca de três vezes (3,19) mais do que o observado na mesma concentração de exossomos do T.A controle (Figura 15). Para a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , não houve alteração na expressão da STAT6 (1,26), enquanto a STAT1 teve sua expressão aumentada (1,67).

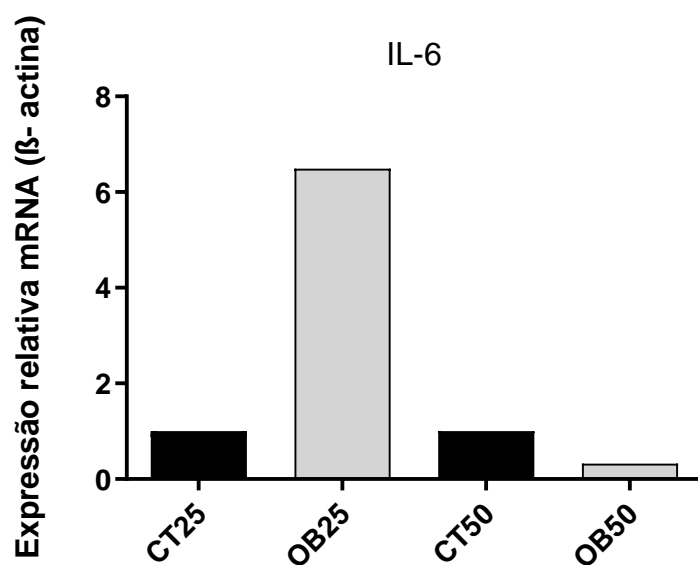


**Figura 14:** Mudança no nível de expressão do fator de transcrição STAT1. BMDMs foram tratados com 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de exossomos do tecido adiposo obeso e controle por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.

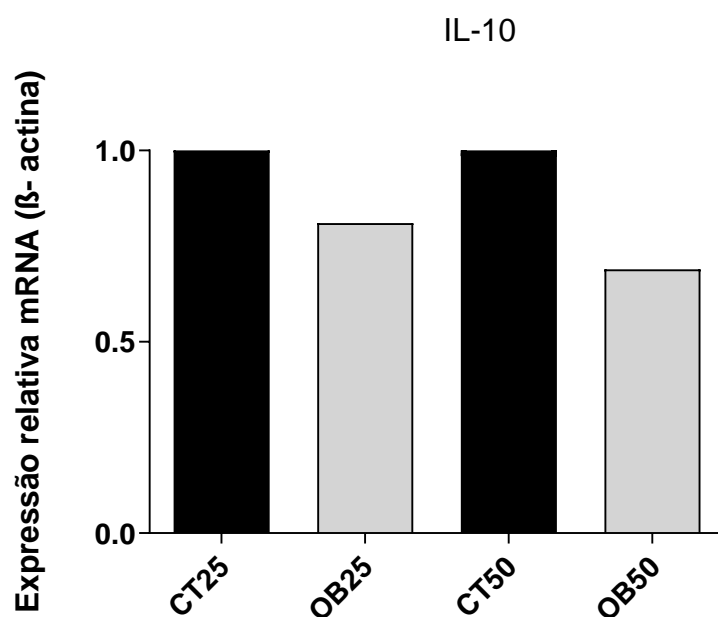
O perfil de transcrição genica de citocinas também foi avaliado. As duas concentrações de tratamento de exossomos do T.A obeso levou a uma discreta redução no perfil de transcrição da citocina IL-10 (0,81 para a menor concentração e 0,69 para maior) (Figura 17). Já para a IL-6, a maior concentração levou a redução da expressão a mais do que a metade (0,32), enquanto o tratamento com a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  levou a expressão seis vezes maior (6,49) (Figura 16).



**Figura 15:** Mudança no nível de expressão do fator de transcrição STAT6. BMDMs foram tratados com 25 e 50 µg/mL de exossomos do tecido adiposo obeso e não obeso por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.



**Figura 16:** Mudança no nível de expressão da citocina IL-6. BMDMs foram tratados com 25 e 50 µg/mL de exossomos do tecido adiposo obeso e controle por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.

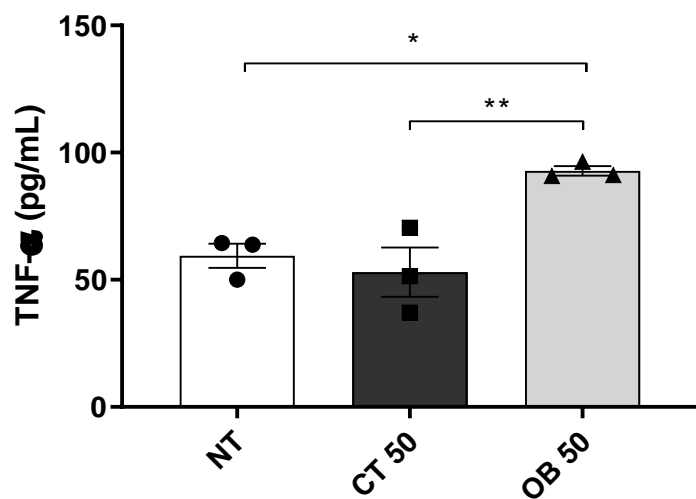


**Figura 17:** Mudança no nível de expressão da citocina IL-10 . BMDMs foram tratados com 25 e 50 µg/mL de exossomos do tecido adiposo obeso e não obeso por 24 horas. Os dados representam a quantidade de gene alvo normalizado em relação ao controle que é considerado 1.

### 5.5 DOSAGEM DE CITOCINA

Para confirmar o perfil pró-inflamatório clássico sugerido pela análise de expressão gênica relativa, o sobrenadante dos macrófagos derivados da medula óssea tratados com os exossomos do tecido adiposo por 24 horas foi avaliado quanto a presença de TNF- $\alpha$  pelo ensaio ELISA.

A concentração de 50 µg/mL foi a que, em conjunto, apresentou dados mais consistentes de expressão dos genes pró-inflamatórios, e por isso foi selecionada para a dosagem de TNF- $\alpha$ . Os dados demonstraram que essa citocina foi significativamente mais expressa no tratamento com exossomos obesos do que comparado ao tratamento com exossomos do tecido adiposo obeso e ao não tratado (Figura 18). Os resultados foram apresentados levando em conta as médias de 3 experimentos independentes.



**Figura 18:** Efeitos do pré-tratamento com exossomos do tecido adiposo na produção de TNF- $\alpha$ . BMDMs foram tratados com exossomos na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 horas. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 4 replicatas de 3 ensaios independentes. \* $p < 0,05$

**DISCUSSÃO**



## 6 DISCUSSÃO

A obesidade é consequência da estreita relação de fatores genéticos, epigenéticos, individuais e ambientais que de modo amplo resultam no acúmulo exacerbado de lipídios no tecido adiposo branco. A prevalência da obesidade e sobrepeso mais do que triplicou desde 1975 e estudos indicam que até 2025 a prevalência global chegará a 18% nos homens e 21% nas mulheres. Além disso, também vindo sendo notório o crescimento nos índices da obesidade infantil, com dados da OMS apontando para em torno de 39 milhões de crianças com sobrepeso ou obesas em 2020. Esses números são alvo de uma preocupação ainda maior, já que a manutenção dessa tendência pode resultar em índices ainda maiores de adultos obesos no futuro (NCD, 2016; WHO 2021).

A disfunção do tecido adiposo está associada a diversas doenças crônicas inflamatórias e metabólicas, como diabetes tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, hepáticas, além de ser fator de risco para doenças infecciosas como a própria COVID-19 (TANG, 2021; GONÇALVES, 2021).

O tecido adiposo é um órgão complexo, dinâmico e adaptável às alterações de armazenamento e demanda energético, processo no qual a diferenciação e hipertrofia dos adipócitos é fundamental. Esse mecanismo é controlado por diversos fatores de transcrição, mediados por PPAR $\gamma$ , que controlam genes lipogênicos e adipogênicos, além de participar da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , um ator chave na inflamação de baixo grau presente na obesidade (TANG, 2021).

Além dos adipócitos maduros e pré adipócitos, diversas outras células compõe o tecido adiposo, como fibroblastos, células endoteliais e componentes imunes (LEE, 2010).

Dentre as células imunes presentes nesse tecido, temos os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, células natural killer e linfócitos. Dentre essas células imunes presentes no tecido adiposo, os macrófagos merecem destaque, perfazendo cerca de 5% do total de células desse tecido. Já para modelos murinos e humanos obesos, a população de macrófagos podem chegar até 50% do componente celular

desse tecido. Apesar da alteração na população de macrófagos residentes ser a mais proeminente, a quantidade das outras células imunes também varia de acordo com o estado metabólico do tecido e, em conjunto, contribuem com a inflamação crônica desse tecido (FERRANTE, 2013, BOUTENS,2016).

O remodelamento do tecido adiposo, tanto do ponto de vista do amadurecimento dos pre adipócitos, adipogênese ou recrutamento de células imunes, só ocorre porque esse tecido metabolicamente ativo se comunica por meio de fatores diversos. No contexto obeso, o processo de remodelamento é alterado e há desequilíbrio na secreção de moléculas bioativas que por sua vez contribui com o recrutamento de monócitos (BAI,2015, LONGO,2019). Em conjunto, os fatores citados levam a crer que a inflamação metabólica do tecido adiposo ocorre graças a interação entre células e moléculas no contexto de excesso de nutrientes e nesse sentido, a interação entre células adiposas e imunes é fundamental (SORISKY,2013).

O tecido adiposo se comunica de maneira ampla, seja de modo sistêmico, com outros órgãos, ou local, no contexto célula a célula pela liberação de adipocinas, citocinas, hormônios, fatores de crescimento (BAI, 2013). Além dessas moléculas, o tecido adiposo secreta, assim como uma vasta gama de outros tipos teciduais, os exossomos, um tipo de vesícula extracelular que interage com diversos tipos células e desencadeiam respostas de cunho fisiológico, patológico e de proliferação e diferenciação (ZHANG,2015).

Os exossomos são estruturas de escala nanométrica, cujo tamanho é bastante variável de acordo com a literatura de referência. Wortzel (2019) e colaboradores classificam o tamanho dessas vesículas entre 30-150 nm de diâmetro. Essas vesículas extracelulares se diferem das demais principalmente devido sua biogênese, que se origina da via endocítica. As membranas que delimitam o endossomo se invaginam, formando vesículas intraluminais no interior do endossomo, formando um compartimento que recebe o nome de corpo multivesicular. Por sua vez, esses corpos se fundem à membrana plasmática e são liberados para o meio extracelular (ZHANG,2019).

A caracterização do exossomos é essencial para os trabalhos utilizando estas vesículas e no presente estudo, foi observado que os exossomos

provenientes do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 possuem tamanho médio de  $131 \pm 36$  nm. Deng e colaboradores (2009) avaliou o tecido adiposo visceral de animais submetidos modelo de obesidade por dieta hiperlipídica (60% do aporte calórico advindo de gorduras) e demonstrou que os exossomos desse tecido possuem entre 60 e 100 nm de diâmetro. Mais recentemente, Xie e colaboradores (2018) também avaliou exossomos do tecido adiposo cutâneo e visceral de animais em modelo de obesidade e demonstrou que o tamanho dessas vesículas extracelulares estava ente 20 e 100 nm. Zhou e colaboradores (2020) por sua vez, avaliou o tecido adiposo marrom, obtido da região subescapular de camundongos C57BL/6 também no modelo de obesidade por dieta e encontrou tamanho variável para os exossomos, com a maior parte dessas vesículas variando entre 90 e 110 nm. Esses dados ilustram que, apesar da origem semelhante, o tamanho dos exossomos pode ser bastante variável, o que compatível com os achados deste trabalho.

A composição dos exossomos parece ser estreitamente relacionada com o tipo de célula e do ambiente do qual se origina (ZHANG, 2019) Podem apresentar em seu interior lipídios, proteínas, ácidos nucleicos como DNA e variados tipos de RNA (miRNA, mRNA, por exemplo) (KIM,2000). Uma vez em contato com a célula alvo os exossomos podem interagir via diversos mecanismos como: estimulação direta através de ligantes presentes na superfície; transferência de receptores ativados; e reprogramação epigenética de células receptoras por meio da entrega de seu conteúdo (ZHANG,2019).

O perfil de polarização de macrófagos vem sendo amplamente estudado em diversas condições patológicas e pode ser sugerido com base no metabolismo da L- arginina (YANG,2014). Nesse sentido, a classificação de macrófagos M1/M2 pode ser baseada na via preferencial do metabolismo desse aminoácido, na qual a via óxido nítrico sintase (iNOS) para NO é associada a M1 e a via da citrulina/ arginase para conversão em ornitina e ureia para M2 (RATH, 2014).

Nossos resultados mostram que o tratamento de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), considerados como perfil M0, com a concentração de 50ug/mL de exossomos provenientes do tecido adiposo obeso revelou um

aumento da expressão da iNOS a níveis dezessete vezes maior do que o expresso na mesma concentração com o tratamento realizado com exossomo do tecido adiposo controle. Nesse mesmo contexto, a expressão relativa de arginase foi reduzida pela metade, quando comparada ao tratamento controle. Esses resultados sugerem que o tratamento com os exossomos do tecido adiposo obeso direciona o metabolismo da L- arginina para a via do óxido nítrico, favorecendo a produção de mediadores pró inflamatórios, e sendo um indicativo da polarização desses macrófagos para M1.

A alteração significativa, porém modesta na concentração de TNF- $\alpha$  (<100pg/mL) no sobrenadante BMDMs tratados com exossomos do tecido adiposo, em conjunto a alteração da expressão da iNOS e arginase, sugere uma relação direta entre os exossomos do tecido adiposo obeso e a manutenção do estado inflamatório crônico de baixo grau bem caracterizado na obesidade.

Bardi e colaboradores (2018) também avaliou o potencial dos exossomos na alteração fenotípica de macrófagos, utilizando marcadores funcionais, como a iNOS e arginase, para caracterização dos perfis M1 e M2. O trabalho avaliou a regulação de iNOS e arginase em macrófagos da linhagem RAW264.7 tratados com exossomos de melanoma e observou a expressão aumentada de mRNA para iNOS e redução da atividade da arginase, sugerindo que o tratamento induziu a polarização para macrófagos M1. Kim e colaboradores (2019) também avaliaram o potencial de alteração fenotípica desencadeado por exossomos em macrófagos. Em seu trabalho foi demonstrado que o tratamento com exossomos de macrófagos previamente polarizados para M2 eram capazes de reprogramar macrófagos M1, direcionando seu fenótipo para M2. Como indicativo dessa alteração, foi avaliado através de imunohistoquímica o sinal imunorreativo tanto da iNOS quanto da arginase, sendo observado que o tratamento com a concentração de 50ug/mL foi capaz de inibir completamente o sinal da iNOS enquanto o da arginase se tornou mais proeminente, similar ao resultado encontrado em nosso estudo.

A via bioquímica na qual a L- arginina é metabolizada resulta em diferentes aspectos funcionais nos macrófagos e duas enzimas são de grande

importância nesse processo: enzima NO sintase induzível (iNOS) e Arginase (Arg). Através da iNOS, macrófagos M1 produzem óxido nítrico (NO), necessário para a resposta citotóxica, mas que também é responsável pela inibição da proliferação celular. A arginase, por sua vez tem um papel na regulação da L-arginina, convertendo essa molécula em L-ornitina e uréia, e utilizando esse metabolito para a proliferação celular e reparo de danos teciduais, típicos de macrófagos M2 (YANG, 2014). A arginase participa da regulação da disponibilidade de arginina para a síntese de NO e dessa forma, participa da regulação imunológica em geral, influenciando em processos inflamatórios, infecciosos e até mesmo no desenvolvimento de câncer (RATH, 2014).

O tratamento com exossomos oriundos de TA de animais obesos também foi capaz de aumentar a expressão gênica da citocina IL-6, além de aumentar a secreção de TNF- $\alpha$  por BMDMs. Esses resultados vão de encontro com o proposto por Zhou e colaboradores (2020), que em uma revisão recente destacou que exossomos do tecido adiposo estimulam a diferenciação de monócitos sanguíneos em macrófagos de perfil inflamatório caracterizado pelo aumento da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 e levando a alterações na via de sinalização JAK/STAT.

A literatura é vasta quando se discute a concentração de uso de exossomos, variando largamente, com trabalhos utilizando 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (BARDI, 2018; HAM, 2018), 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (KIM, 2019), 5 – 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PIAO, 2017). Assim, optamos por usar duas concentrações distintas (25 e 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Apesar de muitos resultados similares, a concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mostrou uma polarização de perfil M1 mais homogênea que a concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Vale ressaltar que os artigos vêm progressivamente abandonando a ideia de perfis exclusivamente M1 ou M2 (MURRAY, 2016) e sim uma polarização com características predominantes M1 ou M2 e seus subtipos.

Em nosso estudo observamos que tratamento de BMDM com exossomos provenientes do tecido adiposo obeso resultou na redução da expressão de STAT1 e aumento da STAT6. A via de sinalização JAK/STAT é crucial para a regulação de respostas imunológicas inatas e adaptativas. Essa via é

negativamente regulada pela presença de proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) que atuam pelo mecanismo de feedback negativo. Redução na expressão de SOCS já foi associada ao aumento dos níveis de mRNA de STAT1 direcionado do perfil de macrófagos para M1. De maneira similar ao que observamos, Liang e colaboradores (2017), demonstrou ainda que em conjunto a regulação negativa das SOCS1, a expressão de IL-4 e IL-10 (Figura 17) também foram suprimidas, ao mesmo tempo que a expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foi significativamente regulada positivamente.

Além da regulação via STATs e SOCs, outro fato de transcrição também participa da polarização M1/M2. O fator 4 semelhantes a Krüppel (KLF) é um regulador transcricional que promove a polarização para M2. O reconhecimento da citocina IL-4 por seu receptor (IL-4R) resulta na fosforilação de STAT6 e dessa forma, aumenta a expressão de KLF4. A presença do miRNA-34a foi destacada por regular negativamente esse fator, reduzindo a polarização para M2, inclusive em BMDM (ZHENG, 2015; PAN, 2019). Como perspectiva, nosso grupo de pesquisa, pretende avaliar o conteúdo dos exossomos do tecido adiposo quanto a presença de miRNAs, já que esses podem participar diretamente do processo de polarização.

Em um trabalho Braune e colaboradores (2017) avaliou-se o tecido adiposo perigonadal de camundongos com obesidade induzida por HFD. A análise da expressão genica demonstrou aumento da expressão genica das citocinas IL-4, IL-13 e IL-6 e seus receptores. O explante foi então estimulado com IL-4 e observou-se que a STAT6 estava cerca de dez vezes mais ativada do que o grupo controle no mesmo tratamento. Esse estudo demonstrou um aumento dos receptores e da produção de IL-6 pelo tecido adiposo e que essa citocina estava associada a proliferação de macrófagos, com esse processo acontecendo via suprarregulação do receptor IL-4R. Sendo ainda demonstrado que a depleção desse mediador direcionou o perfil dos macrófagos residentes a M1 (BRAUNE, 2017).

No presente estudo foi observado que o tratamento por 24 horas com exossomos, proveniente do tecido adiposo de animais com modelo de obesidade induzido via HFD, na concentração de 25 $\mu$ g/mL em BMDMs inibia a

expressão de ARG1, iNOS, STAT-1, com leve redução de IL-10, ao mesmo tempo em que aumentava a expressão de IL-6. De modo interessante, a redução da expressão de ARG1 simultânea ao aumento de IL-6 em BMDMs também foi observada por Dichtl e colaboradores (2021) que demonstrou que a IL-6 é a principal via de regulação da atividade da arginase em macrófagos M1, atuando através da sinalização IL6R $\alpha$  e STAT3.

A concentração de 50 ug/mL foi a que apresentou dados mais homogêneos entre os genes avaliados, no direcionamento de resposta para o perfil M1 afetando a expressão genica relativa de diversos genes relacionados a polarização, com regulação positiva da iNOS, STAT-1 e aumento da secreção de TNF- $\alpha$ . Ao mesmo tempo, esse tratamento levou a redução da expressão de arginase, STAT-6 e a supressão da transcrição de citocinas como IL-6 e IL-10. Ainda, de forma interessante a IL-6 parece ter um papel relevante na proliferação de macrófagos M2 em tecido adiposo, marcando caráter controverso desta citocina (BRAUNE,2017).

As alterações do tecido adiposo na obesidade contribuem para que respostas endócrinas e imunológicas se alterem, levando ao surgimento e piora de doenças metabólicas, que por sua vez contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças como aterosclerose, hipertensão, dislipidemia, diabetes tipo II (DE LORENZO, 2019). A desregulação metabólica e o processo inflamatório decorrente da obesidade são fatores de risco para diversos tipos de câncer, como o câncer de mama, acelerando a progressão tumoral e contribuindo para o aumento de metástase, já demonstrados pelo nosso grupo (MENEZES,2019). As alterações imunológicas decorrentes da obesidade também influenciam no prognóstico de doenças infecciosas virais, sendo relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de complicações clínicas, como pneumonia grave, e ao pior prognóstico na infecção por influenza e pelo SARS-CoV-2 (ANDRADE, 2021), além disso, uma recente análise epidemiológica realizada por nosso grupo demonstrou que a obesidade é um fator significativo para o desenvolvimento das formas mais graves de COVID-19 (GONÇALVES, 2021).



Os resultados demonstrados no presente trabalho sugerem que exossomos de tecido adiposo de obeso conduzem macrófagos M0 para um perfil inflamatório clássico. Dessa forma, se faz necessário a melhor compreensão do papel dos exossomos do tecido adiposo e seu papel na interação com o sistema imunológico. A elucidação mais completa desse mecanismo de comunicação celular, bem como a identificação das moléculas envolvidas, pode vir a sugerir os mecanismos e vias envolvidas nesse processo de imunorregulação e assim contribuir para o melhor entendimento de como o processo inflamatório crônico e de baixo grau presente na obesidade se desenvolve e como e sua associação ao pior prognóstico de doenças crônicas, inflamatórias e câncer.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que os exossomos provenientes do tecido adiposo de animais obesos possuem o potencial de modular o perfil de respostas de macrófagos derivados da medula óssea, direcionando-os para o perfil M1, associado a características pro inflamatórias.



## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ACEDO, S.C., GAMBERO, S., CUNHA, F.G.P. et al. **Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk.** In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* v.49. p.473–478. 2013.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** *Trends in Endocrinology & Metabolism.* v.11, n.8, p.327–332, 2000.
- AKERS, J.C., GONDA, D., KIM, R. et al. **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies.** *J Neurooncol* v.113, p1–11. 2013.
- ANDRADE, F. B.; GUALBERTO, A. C. M.; REZENDE, C.; PERCEGONI, N.; GAMEIRO, J. ; HOTTZ, E. D. . **The Weight of Obesity in Immunity from Influenza to COVID-19.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 638852, 2021.
- APOVIAN, C.M.**Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden.** *Am J Manag Care.* v. 22, p:176-185, 2016.
- ARNER, E.; WESTERMARK, P. O.; SPALDING, K.L.; BRITTON, T.; RYDÉN, M.; FRISÉN, J.; BERNARD, S.; ARNER, P. **Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology.***Diabetes.* v.59, n.1, p. 105-109, 2010.
- BAI, Y .; SUN, Q. **Macrophage recruitment in obese adipose tissue.** *Obesity Reviews*, 16 (2), 127-136. 2013.
- BARDI, G. T.; SMITH, M. A.; HOOD, J. L. **Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization.** *Cytokine.* V.105 p. 63–72. 2018.
- BOUSOIK, E.; & MONTAZERI ALIABADI, H. (2018). **“Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway.** *Frontiers in Oncology*, 8. doi: 10.3389 / fonc.2018.002872018.
- BOUTENS, L., STIENSTRA, R. **Adipose tissue macrophages: going off track during obesity.** *Diabetologia* 59, 879–894.2016.
- BOUTENS, L.; HOOIVELS, J. G.; DHINGRA, S.; CRAMER, R. A.; NETEA, M. G.; STIENSTRA, R. **Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity promotes inflammatory responses.** *Diabetologia.* v.59, p 879-894,2018
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro / Brasil.** Ministério da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Disponível em <[//> 2021.](https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos)

BRAUNE, JULIA; WEYER, ULRIKE; HOBUSCH, CONSTANCE; MAUER, JAN; BRÜNING, JENS C.; BECHMANN, INGO; GERICKE, MARTIN. **IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity.** *The Journal of Immunology*. 2017.

BRAY, G.A.; HEISEL, W.E.; AFSHIN, A.; JENSEN, M. D.; DIETZ, W. H.; LONG, M.; KUSHNER, R. F.; DANIELS, S. R.; WADDEN, T. A.; TSAI, A. G.; HU, B. F.; JAKICIC, J. M.; RYAN, D. H.; WOLF, B. M.; INGE, T.H. **The Science of Obesity Management: An Endocrine Society Scientific Statement.***Endocr Rev*, v. 39, n.2, p. 79–132,2018.

CHA, Y.J., KIM, E.S.; KOO, J.S. **Tumor-associated macrophages and crown-like structures in adipose tissue in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v.170, p. 15–25, 2018.

CHA, Y.J., KIM, E.S.; KOO, J.S. **Tumor-associated macrophages and crown-like structures in adipose tissue in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v.170, p. 15–25, 2018.

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

CHAWLA, A.; NGUYEN, D. K.; GOH, P. S. **Macrophage-Mediated Inflammation In Metabolic Disease.** *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 738–749. 2011.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. **Molecular basis of obesity: current status and future prospects.***Curr Genomics*, v.12, n.3, p.154-68, 2011.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C.**Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.30, n.1, p.255–289, 2014.

CORRÊA, L.H.; HEYN, G.S.; MAGALHAES, K.G. **The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression.** *Cells*, v.8, n.7, 2019.

CRINO, M.; SACKS, G.; VANDEVIJVERE, S.; SWINBURN, B.; NEAL, B. **The influence on population weight gain and obesity of the macronutrient composition and energy density of the food supply.** *CurrObes Rep*. v.4, n.1, p.1-10, 2015.

CURAT, C. A.; MIRANVILLE, A.; SENGENÈS, C.; DIEHL, M.; TONUS, C.; BUSSE, R.; BOULOUMIÉ, A. **From Blood Monocytes To Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction Of Diapedesis By Human Mature Adipocytes.** *Diabetes*, v. 5, 2004.

DE HEREDIA, F.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. **Obesity, inflammation and the immune system.** *Proceedings of the Nutrition Society*, v.71, n.2, p. 332-338, 2012.

DE JONG, O. G.; VERHAAR, M.C.; CHEN, Y.; VADER, P.; GREMMELS, H.; POSTHUMA, G.; SCHIFFELERS, R. M.; GUCEK, M.; VAN BALKOM, B.W. M. **Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes.** *Journal of Extracellular Vesicles*, v.1, n.1, 2012.

DE LORENZO, A., GRATTERI, S., GUALTIERI, P. ET AL. **Why primary obesity is a disease?**. J Transl Med 17, 169. 2019.

DE PERGOLA, G., PANNACCIULLI, N. **Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity**. J Endocrinol Invest, v.25, p.899–904, 2002.

DENG, Z.-B.; POLIAKOV, A.; HARDY, R. W.; CLEMENTS, R.; LIU, C.; LIU, Y.; WANG, J.; XIANG, X.; ZHANG, S.; ZHUANG, X.; SHAH, S. V.; SUN, D.; MICHALEK, S.; GRIZZLE, W. E.; GARVEY, T.; MOBLEY, J.; ZHANG, H.-G. **Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance**. Diabetes, 58(11), 2498–2505. 2019.

DENG, Z.B; POLIAKOV, A.; HARDY, R. W.; CLEMENTS, R.; LIU,C.; LIU, Y.; WANG, J.; XIANG,X; ZHANG, S.; ZHUANG,X.; SHAH, S. V.; SUN, D.; MICHALEK, S.; GRIZZLE, W. E.; GARVEY, T.; MOBLEY, J.; ZHANG, H. G. **Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance**. Diabetes. 2009.

DESPRES, J.P. **Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease: An Update**. Circulation, v.126, n.10, p.1301–1313, 2012.

DICHTL, S.; LINDENTHAL, L.; ZEITLER, L.; BEHNKE, K.; SCHLOSSER, D.; STROBL, B.; SCHELLER, J.; EL KASMI, K.C.; MURRAY, P. Lactate and IL6 define separable paths of inflammatory metabolic adaptation. Sci. Adv. 2021.

DIVELLA, R.; DE LUCA, R.; ABBATE, I.; NAGLIERI, E.; DANIELE, A. **Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation**. Journal of Cancer, v.7, n.15, p. 2346–2359, 2016.

DROLET, R.; RICHARD, C.; SNIDERMAN, A.; MAILLOUX, J.; FORTIER, M.; RHÉAUME, C.; TCHERNF, A. **Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women**. Int J Obes, v.32, p. 283–291, 2008.

EGUCHI, A.; MULYA, A.; LAZIC, M.; RADHAKRISHNAN, D.; BERK, M. P.; POVERP, D.; GORNICKA, A.; FELDSTEIN, A. E. **Microparticles Release By Adipocytes Act As “Find-Me” Signals To Promote Macrophage Migration**. Plos One. 2015.

ENGIN, A. **The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome**. Advances in Experimental Medicine and Biology, p.1–17, 2017.

ERWIG, L.P.; HENSON, P.M. **Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis**. Am. J. Pathol, v. 171, n.1, p. 2-8, 2007.

FANTUZZI, G. **Adipose tissue, adipokines, and inflammation**. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.115, n.5, p. 911–919, 2005.

FERRANTE, A. W. **The immune cells in adipose tissue**. Diabetes, Obesity and Metabolism, 15(s3), 34–38. 2013.

FERRANTE, S. C.; NADLER, E. P.; PILLAI, D. K.; HUBAI, M. J.; WANG, Z.; WANG, J. M.; GORDISH-DRESSMAN, H.; KOECK, E.; SEVILLA, S.; WILES, A. A.; FREISHTAT, R. J. **Adipocyte-derived Exosomal miRNAs: A Novel Mechanism for Obesity-Related Disease**. Pediatric Research, v. 77, p. 447-545, 2015.

FISCHER, J.; GUTI'ERREZ, S.; GANESAN, R.; CALABRESE, C.; RANJAN, R.; CILDIR, G.; HOS, N.J.; RYBNIKER, J.; FRIES, J. W. U.; TERGANONKAR, V.; PLUM, G.; ANTEBIM, A.; ROBINSON, N. **Leptin signaling impairs macrophage defenses against Salmonella Typhimurium.** Proceedings of the National Academy of Sciences v.116 (33) 16551-16560. 2019.

FITZGERALD, W.; FREEMAN, M. L.; LEDERMAN, M. M.; VASILIEVA, E.; ROMERO, R.; MARGOLIS, L. A **System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles.** Scientific Reports, v.8, n.1, 2018.

FRANCKE, A.; HEROLD, J.; WEINERT, S.; STRASSER, R. H.; BRAUN- DULLAEUS, R. C. **Generation of Mature Murine Monocytes from Heterogeneous Bone Marrow and Description of Their Properties.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 59, p.813–825, 2011.

GEOFFREY GERSUK; ATSUNOBU HIRAOKA; KIEREN A. MARR. **Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium.** V.299(1-2), p.99–106.2005

Gersuk, G.; Hiraoka A.; Marr, K.A. **Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium.** , V.299(1-2). P.99–106. 2005

GILLMAN, M.W.; RIFAS-SHIMAN, S.L.; KLEINMAN, K.; OKEN, E.; RICH-EDWARDS, J.W.; TAVERAS, E.M. **Developmental origins of childhood overweight: potential public health impact.** Obesity (Silver Spring), v. 16, n.7, p.1651-1656, 2008.

GIORDANO, A.; SMORLESI, A.; FRONTINI, A.; BARBATELLI, G.; CINTI, S. **Mechanisms In Endocrinology: White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ.** Eur J Endocrinol, v.170, p.159–171, 2014.

GONÇALVES, D.A; RIBEIRO, V.; GUALBERTO,A.; PERES, F.; LUCONI,M.; GAMEIRO, J. **"COVID-19 and Obesity: An Epidemiologic Analysis of the Brazilian Data"**, International Journal of Endocrinology, vol. 2021.

GORDON, S. **Alternative activation of macrophages.** Nature Reviews Immunology, v.3, n.1, p. 23–35, 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. **Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions.** Immunity, v.32, n.5, p.593-604, 2010.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. **Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment.** Frontiers in Immunology, v.9, 2018.

GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. **Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism.** Am J Clin Nutr., v.83, 2006.

GURUNATHAN, S.; KANG, M. H.; JEYARAJ, M.; QASIM, M.; KIM, J. H. Review of the Isolation, **Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes.** Cells, v.8, 2019

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T.G.; PÁSZTÓI, M.; PÁÇ, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ,V.; PÁLLINGER,E.; PAP,E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A. **Membrane**

**vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.** Cell. Mol. Life Sci., v. 68, p. 2667–2688, 2011.

HAEMER, M.A.; HUANG, T.T.; DANIELS, S.R.; **The Effect of Neurohormonal Factors, Epigenetic Factors, and Gut Microbiota on Risk of Obesity.** Prev Chronic Dis, v.6, n.3, 2009.

HAM, S., LIMA, L. G., CHAI, E. P. Z., MULLER, A., LOBB, R. J., KRUMEICH, S., MÖLLER, A. **Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via gp130/STAT3 Signaling.** Frontiers in Immunology, V9. 2018.

HEYN, G. S., CORRÊA, L. H., & MAGALHÃES, K. G. **The Impact of Adipose Tissue-Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer.** Frontiers in endocrinology, 11, 563816. 2020.

IHLE, J. N.; GILLILAND, D. G. **Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders.** Curr. Opin Genet. Dev., New York 17:8-14, 2007.

IKEDA, K.; MARETICH, P.; KAJIMURAM S. **The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes.** Trends Endocrinol Metab., v.29, n.3, p. 191-200, 2018.

JAMES, W.P.T. **The Fundamental Drivers Of The Obesity Epidemic.** Obesity Reviews, v. 9, 2008.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. **Environmental epigenomics and disease susceptibility.** Nature Reviews Genetics, v. 8, p.253–262, 2007.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A. E.; CUSHMAN, S. W.; PERIWAL, V. **Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth.** PLoS Comput Biol. V.5, n.3, 2009.

JUNG, J.U.; CHOI, M.S. **Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** Int J Mol Sci, v.15, n.4, p.6184–6223, 2014.

KANG, Y. E.; KIM, J. M.; JOUNG, K. H.; LEEM J.H.; YOU, B. R.; CHOI, M. J.; RYU, M. J.; KO, Y. B.; LEE, M. A.; LEEM J.; KU, B. J.; KI, M. S.; LEE, H. K.; KIM, H. J. **The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction.** PLoS One, v.11, n.4, 2016.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.9, n. 6, p.2548–2556, 2004.

KIM, H.; WANG, S. Y.; KWAK, G.; YANG, Y.; KWON, I. C.; KIM, S.H. **Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing.** Advanced Science, 6(20). 2019.

KIM, A.; CHUNG, E.Y.; MA, X. **Immunological Consequences of Macrophage-Mediated Clearance of Apoptotic Cells.** Cell Cycle, v.4, n.2, p. 234-23, 2005.

KIM, D.B.; KANG, B.; KIM, O.H.; CHOI, D.; LEE, J.; KIM, S.R.; GO, G.; YOON, Y.J.; KIM, J.H.; JANG, S.C.; PARK, K.S.; CHOI, E.J.; KIM, K.P.; DESIDERIO, D.M.; KIM, Y.K.

LÖTVALL, J.; HWANG, D.; GHO, Y.S **EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles.** Journal of Extracellular Vesicles. 2013.AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** Trends in Endocrinology & Metabolism. v.11, n.8, p.327–332, 2000.

KRANENDONK, M. E. G.; VISSEREN, F. L. J.; HERWAARDEN, J. A. V.; NOLTE-T HOEN, E. M. N.; JAGER, W. DE; WAUBEN, M. H. M.; KALKHOVEN, E. **Effect of Extracellular Vesicles of Human Adipose Tissue on Insulin Signaling in Liver and Muscle Cells.** Obesity, v.22, p. 2216–2223, 2014.

KUWABARA Y.S.; MELO, S.A; SOARES, F.A.; CALIN, G. A. **The Fusion of Two Worlds: Noncoding Rnas And Extracellular Vesicles - Diagnostic And Therapeutic Implications.** International Journal OfOncologia, v.46, p 17-27, 2015.

LAWRENCE, T., NATOLI, G. **Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity.** Nat Rev Immunol v.11. p.750–761. 2011.

LEE K, W.; ABRAHAMOWICZ, M.; LEONARD, G.T.; RICHER L.; PERRON, M.; VEILLETTE, S.; REISCHL, E.; BOUCHARD, L.; GAUDET, D.; PAUS, T.; PAUSOVA, Z.**Prenatal exposure to cigarette smoke interacts with to modulate dietary preference for fat.** J Psychiatry Neurosci, v.40, n.1, 2015.

LEE, J. **"Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes."** Arch Pharm Res 36(2): 208-22. 2010.

LI, H., JIANG, T., LI, M.-Q., ZHENG, X.-L., & ZHAO, G.-J. LI, H., JIANG, T., LI, M.-Q., ZHENG, X.-L., & ZHAO, G.-J. **Transcriptional Regulation of Macrophages Polarization by MicroRNAs.** Front. Immunol. 2018.

LIANG, Y., TANG, H., CHEN, Z., ZENG, L., WU, J., YANG, W., LI, Z., MA, Z. **"Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type".** Molecular Medicine Reports 16.5. 2017.

LONGO, M., ZATTERALE, F., NADERI, J., PARRILLO, L., FORMISANO, P., RACITI, G. A., BEGUINOT, F., & MIELE, C. **Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications.** International journal of molecular sciences, 20(9), 2358. 2019.

LÖTVALL, J.; HILL, A.F.; HOCHBERG, F.; BUZÁS, E. I.; DI VIZIO, D.; GARDINER, C.; GHO, I, S.; KUROCHKIN, I. V.; MATHIVANAN, S.; QUESENBERY, P.; SAHOO, S.; TAHARA, H.; WAUBEN, M. H.; WITWER, K.W.; THÉRY,C. **Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles,** Journal of Extracellular Vesicles, v.3, n.1, 2014.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J.L.; SALTIEL, A.R. **Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.** J Clin Invest., v.117, n.1, p.175–184, 2007.

MAIOLI, T. U.; GONÇALVES, J. L.; MIRANDA, M. C. G.; MARTINS, V. D.; HORTA, L. S.; MOREIRA, T. G.; GODARD, A.L.B.; SANTIAGO, A. F.; FARIA, A. M. C. **High Sugar And Butter (HSB) Diet Induces Obesity And Metabolic Syndrome With Decrease In Regulatory T Cells In Adipose Tissue Of Mice.** *Inflammation Research*, v. 65, 2016.

MARLATT, K. L.; RAVUSSIN, E. **Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings.** *Current Obesity Reports*. v. 6. p. 389–396. doi:10.1007/s13679-017-0283-6. 2017.

MARTI, A.; MARCOS, A.; MARTINEZ, J. **Obesity and immune function relationships.** *Obes Rev*. v. 2. p.131-40. 2001.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. **Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective.** *Annual Review of Immunology*, v. 27, n.1, p. 451–483, 2009.

MASOODI, M.; KUDA, O.; ROSSIMEISL, M.; FLACHS, P.; KOPECKY, J. **Lipid Signaling In Adipose Tissue: Connecting Inflammation & Metabolism** *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, v. 1851, p. 503-518, 2015.

MATHIEU, M.; MARTIN-JAULAR, L.; LAVIEU, G. THÉRY, C. **Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication.** *Nat Cell Biol*, v.21, p. 9–17, 2019.

MAURIZI, G.; GUARDIA, L.D.; MAURIZI, A.; POLONI, A. **Adipocytes Properties and Crosstalk with Immune System in Obesity-Related Inflammation.** *Journal of Cellular Physiology*, v.233, p.88–97,2018.

MCCLELLAND, J.; DALTON, B.; KEKIC, M.; BARTHOLDY, S.; CAMPBELL, I. C.; SCHMIDT, U. **A systematic review of temporal discounting in eating disorders and obesity: behavioural and neuroimaging findings.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*.2016

MENEZES, G. C. ; SALVADOR, P. ; SOARES, S. M. ; BARROS, L. R. C. ; XAVIER, F. H. C. ; ABDO, L. M. ; GUALBERTO, A. C. M. ; MACEDO, G. C. ; CLAVIJO-SALOMON, M. A. ; GAMEIRO, J. . **4T1 mammary carcinoma colonization of metastatic niches is accelerated by obesity.** *FRONTIERS IN ONCOLOGY*, v. 9, p. 1-12, 2019.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 958–969, 2008.

MUIR, L.A.; NEELEY, C.K.; MEYER, K.A.; BAKER, N.A.; BROSIUS, A.M.; WASHABAUGH, A.R.; VARBAN, O.A.; FINKS, J.F.; ZAMARRON, B.F.; FLESHER, C.G.; ET AL. **Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity.** *Obesity* v.24, p. 597–605, 2016.

MULLER, G.; SCHNEIDER, M.; BIEMER-DAUB, G., WIED, S. **Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis.** *Cell Signal*, v. 3, p 1207–1223, 2011.

MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V.; LATINI, C.; MUZZONIGRO, G.; CASTELLUCCI, M.; CINTI, S. **Dead adipocytes, detected as crown-like structures,**



**are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice.** Journal of Lipid Research, v.49, n.7, p.1562–1568, 2008.

MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GOERDT, S., GORDON, S., HAMILTON, J. A., IVASHKIV, L. B., LAWRENCE, T., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MARTINEZ, F. O., MEGE, J. L., MOSSER, D. M., NATOLI, G., SAEIJ, J. P., SCHULTZE, J. L., SHIREY, K. A., SICA, A., WYNN, T. A. **Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines.** Immunity. V.41(1). P.14–20. 2014APOVIAN, C.M.**Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden.** Am J Manag Care. v. 22, p:176-185, 2016.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. **Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization.** J Leukoc Biol., v. 89, n.4, p. 557–563, 2011.

**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.** doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Lancet. V.87. p.1377–1396. 2016

NEIL, G. B.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. **Shedding Light On The Cell Biology Of Extracellular Vesicles.** Nature Reviews: Molecular Cell Biology, v. 19, 2018.

OBREGON, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; GERBER, P.; GEHR, P.; NICOD, L.P. **Active uptake of dendritic cell-derived exovesicles by epithelial cells induces the release of inflammatory mediators through a TNF-alpha-mediated pathway.** Am J Pathol., v.175, p. 696–705, 2009.

ODEGAARD, JUSTIN I.; CHAWLA, AJAY. **Alternative Macrophage Activation and Metabolism.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v.6(1), p. 275–297.2011

OGREN, M.P.; LOMBROSO, P.J. **Epigenetics: behavioral influences on gene function, part I. Maternal behavior permanently affects adult behavior in offspring.** J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. v.47, n.3, p.240–244, 2008.

OKORODUDU D.O.; JUMEAN M.F.; MONTORI, V.M.; ROMERO-CORRAL, A.; SOMERS, V.K.; ERWIN, P.J.; LOPEZ-JIMENEZ, F. **Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis.** Int J Obes (Lond), v.34, n.5, p.791-799, 2010.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. **Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance.** Annual Review of Physiology, v.72, n.1, p.219–246,2010.

OPAS. Doenças transmissíveis e não transmissíveis. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=569:conceito-doencas-cronicas-nao-transmisiveis&Itemid=463](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=569:conceito-doencas-cronicas-nao-transmisiveis&Itemid=463)>

OUELLET, V.; LABBÉ, S. M.; BLONDIN, D. P.; PHOENIX, S.; GUÉRIN, B.; HAMAN, F.; CARPENTIER, A. C. **Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans.** Journal of Clinical Investigation, v.122, n.2, p. 545–552, 2012

PAN, Y.; HUI, X.; HOO, R.L.C.; YE, D.; CHAN, C.Y.C.; FENG, T.; WANG, Y.; LAM, K.S.L.; XU, A. **Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation.** *J Clin Invest.*, v.129, n.2.p. 834-849, 2019.

PIAO, Y. J., KIM, H. S., HWANG, E. H., WOO, J., ZHANG, M., & MOON, W. K. **Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis.** *Oncotarget.* V.9(7), p.7398–7410. 2018.AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** *Trends in Endocrinology & Metabolism.* v.11, n.8, p.327–332, 2017.

PIAO, Y. J., KIM, H. S., HWANG, E. H., WOO, J., ZHANG, M., & MOON, W. K. **Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis.** *Oncotarget.* V.9(7), p.7398–7410. 2018.AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** *Trends in Endocrinology & Metabolism.* v.11, n.8, p.327–332, 2000.

PIDSLEY, R., ZOTENKO, E., PETERS, T.J. et al. **Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling.** *Genome Biol.* V.17, p.208. 2016.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends.** *J Cell Biol.* v.200, n.4, p. 373–383, 2013.

RATH, M., MÜLLER, I., KROPF, P., CLOSS, EI, MUNDER, M. **Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages.** *Frontiers in Immunology*, 5. 2014.

RAUSCH, M.; WEISBERG, S.; VARDHANA, P.; TORTORIELLO, D. V. **Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration.** *Int J Obes.* v.32, p. 451–463, 2008.

REDDON, H.; GUÉANT, J.L.; MEYRE, D. **The importance of gene–environment interactions in human obesity.***ClinNeurosci Res.*, v.130, n.18, p. 1571–1597, 2016.

SÁNCHEZ, A. F.; SANTILLÁN, E. M.; BAUTISTA, M.; ESQUIAVEL-SOTO, J.; GONZÁLEZ, A. M.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; MONTIEL, I. D.; RIVERA, G. S.; VALADEZ-VEJA, C.; GONZÁLEX, J. A. M. **Inflammation, Oxidative Stress, And Obesity.** *International Journal Of Molecular Sciences*, v.12, p. 3117-3132, 2011.

SASAKI, T.; MORO, K.; KUBOTA, T.; KUBOTA, N.; KATO, T.; OHNO, H.; NAKAE, S.; KIYASU, S. **Innate Lymphoid Cells In The Induction Of Obesity.** *Cell Reports.*, v. 28, p 202-217, 2019.

SELL, H.; HABICH, C.; ECKEL, E. **Adaptive Immunity In Obesity And Insulin Resistance.** *Nature Reviews Endocrinology.*, v.8, p. 709–716, 2012.

SHUAI, K., LIU, B. **Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system.** *Nat Rev Immunol* **3**, 900–911. 2003.

SICA, A. MANTOVANI, A. **Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.** *J Clin Invest.* V. 12. 2012.

SIKARIS, K. A. **The Clinical Biochemistry of Obesity.***The Clinical Biochemist Reviews*sv. 25, 2004.

SKELTON, J.A.; IRBY, M.B; GRZYWACZ, J.G.; MILLER, G. **Etiologies of obesity in children: nature and nurture.** *Pediatr Clin North Am.*, v. 58, n.6, p. 1333-1354, 2011.

SORISKY A, MOLGAT AS, GAGNON A. **Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go?** *Adv. Nutr.* 4,67–75. 2013.

SPALDING, K.; ARNER, E.; WESTERMARK, P.; et al. **Dynamics of fat cell turnover in humans.** *Nature*, v.453, p. 783–787,2008.

SRIVASTAVA, S.; VEECH, R.L. **Brown and Brite: The Fat Soldiers in the Anti-obesity Fight.** *Front. Physiol.*, v.10, p.10–13, 2019.

STAHL, P. D.; RAPOSO, G. **Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis.** *Physiology*, v.34, n.3, p.169–177, 2019.

STOUT, R.D.; JIANG, C.; MATTA, B.; TIETZEL, I.; WATKINS, S.K.; SUTTLES, J. **Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences.** *J Immunol*, v.175, n.1, p. 342-349, 2005.

SUN, K.; SCHERER, P. E. **Adipose Tissue Dysfunction: A Multistep Process.** *Novel Insights into Adipose Cell Functions*, p. 67–75, 2010.

SWINBURN, B.A.; SACKS, G.; HALL K.D.; et al. **The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments.** *Lancet.*, v.378, n.9793, p.804–814, 2011.

TANG, P., VIRTUE, S., GOIE, J.Y.G. ET AL. **Regulation of adipogenic differentiation and adipose tissue inflammation by interferon regulatory FACTOR 3.** *Cell Death Differ.*2021.

TCHOUKALOVA, Y.; KOUTSARI, C.; JENSEN, M. **Committed subcutaneous preadipocytes are reduced in human obesity.** *Diabetologia*, v.50, p.151–157, 2007.

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

THÉRY, C., AMIGORENA, S.; RAPOSO, L.; CLAYTON, U. **Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids.** *Current Protocols in Cell Biology*, v. 30, 2006.

TRAYHURN,P.**Endocrine And Signalling Role Of Adipose Tissue: New Perspectives On Fat.***Acta PhysiologicaScandinavica*, v. 184, 2005.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS; A. et al. **Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.***Nat CellBiol*, v.9, p.654–659, 2007.

VAN DIJK, S. J.; MOLLOY, P. L.; VARINLI, H.; MORRISON, J. L.; MUHLHAUSLER, B. S. **Epigenetics and human obesity.** *International Journal of Obesity*, v.39, n.1, p. 85–97, 2014.

VIEIRA, M. S. **Avaliação do Papel de Exossomos Isolados do Plasma de Pacientes com Câncer de Mama e de Linhagem MCF-7 na Diferenciação de Células Dendríticas: Implicações na Resposta Imune Antitumoral.** *Dissertação*

(Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de São João del-Rey, Divinópolis, 2016.

WANG, N., LIANG, H., & ZEN, K. **Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance.** *Frontiers in Immunology*, 5. 2014.

WANG, J.G.; WILLIAMS, J.C.; DAVIS, B.K.; JACOBSON, K.; DOERSCHUK, C.M.; TING, J.P.; et al. **Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 beta-dependent manner.** *Blood*, v.118, p. 2366–2374, 2011.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *Journal of Clinical Investigation*, v.112, n.12, p.1796–1808, 2003.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. **Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue.** *Journal of Clinical Investigation*, v.112, n.12, p.1785–1788, 2003.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i–xii, 1–253.

WHO. Non communicable diseases. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>

WORTZEL, I., DROR, S., KENIFIC, C. M., AND LYDEN, D. **Exosome-mediated metastasis: communication from a distance.** *Dev. Cell* 49, 347–360. 2019.

WU, J; BOSTRÖM, P.; SPARKS, L. M.; YE, L.; CHOI, J.H.; GIANG, A.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K.A.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; LICHTENBELT, W. D. M.; HOEKS, J.; ENERBÄCK, S.; SCHRAUWEN, P.; SPIEGELMAN, B.M. **Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human.** *Cell*, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012.

WU, S.F.; NOREN HOOTEN, N.; FREEMAN, D.W. *et al.* **Extracellular vesicles in diabetes mellitus induce alterations in endothelial cell morphology and migration.** *J Transl Med*, v.18, n. 230, 2020.

XIE, Z., WANG, X., LIU, X., DU, H., SUN, C., SHAO, X., TIAN, J., GU, X., WANG, H., TIAN, J., & YU, B. **Adipose-Derived Exosomes Exert Proatherogenic Effects by Regulating Macrophage Foam Cell Formation and Polarization.** *Journal of the American Heart Association*, 7(5). 2018.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; CHEN, H. **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** *Journal of Clinical Investigation*, v.112, n.12, p. 1821–1830, 2003.

YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R.M.; ANDREU, Z.; BEDINA ZAVEC, A.; BORRÀS, F. E.; BUZAS, E. I.; BUZAS, K.; CASAL, E.; CAPPELLO, F.; CARVALHO, J.; COLÁS, E.; CORDEIRO-DA SILVA, A.; FAIS, S.; FALCON-PEREZ, J. M.; GHOBRIAL, I. M.; GIEBEL, B.; GIMONA, M.; GRANER, M.; GURSEL, I.; GURSEL, M.; HEEGAARD, N. H. H.; HENDRIX, A.; KIERULF, P.; KOKUBUN, K.; KOSANOVIC, M.; KRALJ-IGLIC, V.; KRÄMER-ALBERS, E.M.; LAITINEN, S.; LÄSSER, C.; LENER, T.; LIGETI, E.; LINÉ, A.; LIPPS, G.; LLORENTE, A.; LÖTVALL, J.; MANČEK-KEBER, M.; MARCILLA,

A.; MITTELBRUNN, M.; NAZARENKO, I.; NOLTE-T HOEN, E. N.M.; NYMAN, T. A.; O'DRISCOLL, L.; OLIVAN, M.; OLIVEIRA, C.; PÁLLINGER, É.; DEL PORTILLO, H. A.; REVENTÓS, J.; RIGAU, M.; ROHDE, E.; SAMMAR, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; SANTARÉM, N.; SCHALLMOSER, K.; STAMPE OSTENFELD, M.; STOORVOGEL, W.; STUKELJ, R.; VAN DER GREIN, S. G.; HELENA VASCONCELOS, M.; WAUBEN, MARCA H. M.; DE WEVER, OLIVIER . **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions**. *Journal of Extracellular Vesicles*, v.4, n.1, p. 27066, 2015

YANG Z, MING XF. **Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders**. *Front Immunol*. 2014.

YANG, J., STARK, G. **Roles of unphosphorylated STATs in signaling**. *Cell Res* **18**, 443–451. (2008). <https://doi.org/10.1038/cr.2008.41>

YING, WEI; RIOPEL, MATTHEW; BANDYOPADHYAY, GAUTAM; DONG, YI; BIRMINGHAM, AMANDA; SEO, JONG BAE; OFRECIO, JACHELLE M.; WOLLAM, JOSHUA; HERNANDEZ-CARRETERO, ANGELINA; FU, WENXIAN; LI, PINGPING; OLEFSKY, JERROLD M. **Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity**. *Cell*. 2017.

YU, T., GAN, S., ZHU, Q. ET AL. **Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24**. *Nat Commun* **10**, 4353.2019.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPU, S.; et al. **Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study**. *Lancet.*, v.366, n.9497, p.1640-1649, 2005.

ZABOROWSKI, M.P.; BALAJ, L.; BREAKEFIELD, X.O.; LAI, C. P. **Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, And Methods of Study**, *Bioscience*, v. 65, n.8, p. 783-797, 2015.

ZHANG Y, ZHANG M, ZHONG M, SUO Q AND LV K. **Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages**. *Int J Mol Med* **31**: 797-802, 2013.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. **The Isolation and Characterization of Murine Macrophages**. *Current Protocols in Immunology*. 2008.

ZHANG, Y., LIU, Y., LIU, H. ET AL. **Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential**. *Cell Biosci* **9**, 19. 2019.

ZHANG, Y.; HONGLIANG, M.; CHANG, X.; CHEN, F.; ZHU, Y.; HAN, X. **Adipocyte-Derived Microvesicles From Obese Mice Induce M1 Macrophage Phenotype Through Secreted Mir-155**. *Journal Of Molecular Cell Biology.*, v. 8, p. 505–517, 2016.

ZHANG, YAN; YU, MEI; TIAN, WEIDONG. **Physiological and pathological impact of exosomes of adipose tissue**. *Cell Proliferation*, **49**(1), 3–13. 2016.

ZHAO, H., SHANG, Q., PAN, Z., BAI, Y., LI, Z., ZHANG, H., ... WANG, Q. **Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue**. *Diabetes*, v.67, n.2, p. 235–247, 2017.

ZHENG, CHUNXING; YANG, QIAN; XU, CHUNLIANG; SHOU, PEISHUN; CAO, JIANCHANG; JIANG, MENGHUI; CHEN, QING; CAO, GANG; HAN, YANYAN; LI, FENGYING; CAO, WEI; ZHANG, LIYING; ZHANG, LI; SHI, YUFANG; WANG, YING. **CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015.

ZHOU, XUEYING; LI, ZHELONG; QI, MEIHAO; ZHAO, PING; DUAN, YUNYOU; YANG, GUODONG; YUAN, LIJUN. **Brown adipose tissue-derived exosomes mitigate the metabolic syndrome in high fat diet mice.** Theranostics, 10(18), 8197–8210. 2020.

ZHOU, Y., & TAN, C. **miRNAs in Adipocyte-Derived Extracellular Vesicles: Multiple Roles in Development of Obesity-Associated Disease.** Frontiers in Molecular Biosciences, 7. 2020.