

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

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA VENERANDO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM
PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE TECIDO ADIPOSEO
HUMANO.**

JUIZ DE FORA

2024

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA VENERANDO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM
PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE TECIDO ADIPOSE
HUMANO.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Jacy Gameiro

JUIZ DE FORA

2024

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

Venerando, Letícia Aparecida Ferreira .

Avaliação do perfil de Macrófagos tratados com pequenas Vesículas Extracelulares de Tecido Adiposo Humano. / Letícia Aparecida Ferreira Venerando. -- 2024.

55 p. : il.

Orientador: Prof^a Dr^a Jacy Gameiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Obesidade. 2. Tecido Adiposo. 3. Macrófagos. 4. Vesículas extracelulares. 5. Comunicação celular. I. Gameiro, Prof^a Dr^a Jacy, orient. II. Título.

Letícia Aparecida Ferreira Venerando

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM PEQUENAS VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Dissertação
apresentada
ao Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia &
Doenças
Infectoparasitárias

Aprovada em 03 de outubro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Drª. Lohanna Palhinha do Amaral

Fundação Oswaldo Cruz



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Professor(a)**, em 05/11/2024, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lohanna Palhinha do Amaral, Usuário Externo**, em 05/11/2024, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa D Avila da Silva Bizarro, Professor(a)**, em 05/11/2024, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2000676** e o código CRC **CFA4D64A**.

Dedico este trabalho a minha ancestralidade,
a todos meus antepassados que perderam suas vidas
e pisaram neste chão antes de mim.
As forças que regem minha vida e guardam meus caminhos.
A senhora das águas e a vida do compasso da terra!

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio, a minha mãe por ser a minha maior incentivadora, ao meu pai, meu irmão e cunhada, por sempre estarem ao meu lado, oferecendo carinho, compreensão e força ao longo dessa jornada.

À Luiza, por sempre estar disposta a tornar esse momento mais fácil, por não me deixar desistir, pelos dias em que ficou até tarde me acompanhando nos experimentos. Por ser Lua na minha vida: iluminando meus caminhos, trazendo renovação, calma, me acolhendo e me fazendo feliz.

Agradeço à equipe do laboratório por todo aprendizado, amizade e companheirismo. À minha orientadora Jacy, por sempre me lembrar da minha capacidade quando eu já não acreditava.

Aos amigos de bancada, risadas, choros, fofocas e conversas, que de alguma forma estão ou passaram pela minha vida deixando saudade e aprendizados: Aninha, Augusto, Bianca, Diego, Letícia, Lucas, Luiza, Maria Júlia, Milena, Otto, Paula, Sara e Thais.

Aos colaboradores do Laboratório de Imunotrombose da UFJF, pelos ensinamentos e ajuda na execução de experimentos. À Fernanda, secretária da pós-graduação, pelo auxílio e paciência com as burocracias administrativas.

Aos técnicos do LIP, Bárbara e Rogério, por todo apoio e por sempre estarem dispostos a escutar nossos lamentos e alegrias.

As minhas amigas: Amanda, Bianca, Gabriella, Louise, Maria Elizia, Marissa, Pâmela, Paula e Suellen. Por sempre me lembrarem quem eu sou, me arrancarem sorrisos, enxugarem minhas lágrimas, pelas fofocas, companhia e por sempre estarem dispostas a me acolher.

A todos meus antepassados e a espiritualidade que me rege e guia.

A todos que passarem pela minha vida durante essa jornada e de alguma forma me ajudaram.

Agradeço ao suporte financeiro da CAPES, CNPq, Serrapilheira e FAPEMIG.

“Temos que falar sobre libertar mentes tanto quanto sobre libertar a sociedade.” Angela Davis

“Que o meu texto seja um lugar onde as mulheres se sintam em casa.”

Conceição Evaristo

RESUMO

A obesidade é uma condição crônica descrita pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (TA), resultante de um balanço energético positivo e associado a fatores genéticos e ambientais. Este excesso de TA é um importante fator de risco para doenças como diabetes tipo 2 e hipertensão. Antigamente visto apenas como um reservatório de energia, o TA é agora reconhecido como um órgão ativo com funções metabólicas, imunológicas e endócrinas, que secretam adipocinas e outros fatores bioativos que afetam o metabolismo e a inflamação. Na obesidade, ocorre uma infiltração de células imunológicas, principalmente macrófagos, sem TA. Esses macrófagos podem adotar fenótipos pró-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios (M2), e o desequilíbrio entre esses fenótipos contribui para a inflamação crônica observada em indivíduos obesos. Recentemente, as vesículas extracelulares (VEs) derivadas do TA ganharam destaque, pois são responsáveis por mediar a comunicação intercelular e influenciar a inflamação e o metabolismo. Estudos indicam que as pequenas vesículas extracelulares (pVEs) originadas de adipócitos obesos carregam proteínas, lipídios e RNAs que podem exacerbar a inflamação e a resistência à insulina, demonstrando seu papel na interseção entre metabolismo e imunidade. Esses pVEs apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, MCP-1 e TGF- β , além de óxido nítrico, intensificando a resposta inflamatória sistêmica. Além disso, os pVEs obesogênicos alteram significativamente a expressão gênica dos macrófagos, destacando-se a regulação de genes inflamatórios como CCL-2 e IL-1 β .

Palavra-chave: Obesidade, Tecido adiposo (TA), Funções metabólicas, imunológicas e endócrinas, Inflamação, Macrófagos, Vesículas extracelulares (VEs), Pequenas vesículas extracelulares (pVEs) e comunicação celular.

ABSTRACT

Obesity is a chronic condition described by the excessive accumulation of adipose tissue (AT), resulting from a positive energy balance and associated with genetic and environmental factors. This excess AT is an important risk factor for diseases such as type 2 diabetes and hypertension. Once seen only as an energy reservoir, the AT is now recognized as an active organ with metabolic, immunological and endocrine functions, which secretes adipokines and other bioactive factors that affect metabolism and inflammation during obesity, there is an infiltration of immune cells, mainly macrophages, into the AT. These macrophages can adopt pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotypes, and the imbalance between these phenotypes contributes to the chronic inflammation observed in obese individuals. Recently, AT-derived extracellular vesicles (EVs) have gained prominence, as they are responsible for mediating intercellular communication and influencing inflammation and metabolism. Studies indicate that small extracellular vesicles (pVEs) originating from obese adipocytes carry proteins, lipids and RNAs that can exacerbate inflammation and insulin resistance, demonstrating their role in the intersection between metabolism and immunity. These EVPs have high levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-8, MCP-1 and TGF- β , as well as nitric oxide, intensifying the systemic inflammatory response. In addition, obesogenic EVPs significantly alter macrophage gene expression, particularly the regulation of inflammatory genes such as CCL-2 and IL-1 β .

Keyword: Obesity, Adipose tissue (AT), Metabolic, immunological and endocrine functions, Inflammation, Macrophages, Extracellular vesicles (EVs), Small extracellular vesicles (sVE) and cell communication.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CCL-2	Quimiocina 2
cDNA	DNA complementar
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DCV	Doenças cardiovasculares
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Retículo endoplasmático
EUT	Eutrófico
FEV	Fração estromovascular
FFAS	Ácidos graxos livres
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-R	Receptor para interleucina
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófagos ativados classicamente
M2	Macrófagos ativados alternativamente
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos

miRNAs	MicroRNAs
MØ	Macrófagos não ativados
mRNA	RNA mensageiro
MSC	Células tronco mesenquimais
ncRNAs	RNAs não codificantes
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NT	Não tratado
OB	Obeso
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PMN	Células polimorfonucleares do sangue periférico
PPAR γ	Proliferador de peroxissoma
pVEs	Pequenas vesículas extracelulares
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SM	Síndrome metabólica
SOCS3	Proteína supressora de sinalização de citocinas
TA	Tecido Adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABv	Tecido adiposo branco visceral
TABsc	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAM	Tecido adiposo marrom

TAMS	Macrófagos residentes do tecido adiposo
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UCP-1	Proteína desacopladora 1
VEs	Vesículas extracelulares
WOF	Federação mundial de obesidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidade por Patologias Relacionadas ao IMC Elevado.....	16
Figura 2. Microambiente do tecido adiposo branco eutrófico versus obeso....	20
Figura 3. Impacto da obesidade no tecido adiposo.....	20
Figura 4. Modulação patológica do tecido adiposo.....	23
Figura 5. Fluxograma desenho experimental proposto.....	28
Figura 6. Protocolo de obtenção de pVEs tecido adiposo.....	30
Figura 7. Protocolo de obtenção de PBMC e diferenciação em macrófagos....	32
Figura 8. Distribuição do tamanho das pVEs derivadas do tecido adiposo.....	36
Figura 9. Microscopia eletrônica de pequenas vesículas extracelulares isoladas de TA obeso.....	36
Figura 10. Internalização de VEs do TA obeso pelo macrófago.....	37
Figura 11. Análise da capacidade de pequenas vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obesogênico transportarem mediadores inflamatórios.....	38
Figura 12. Análise dos níveis de NO em pequenas vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obesogênico.....	39
Figura 13. Efeito das pVEs do TA obesogênico na produção de óxido nítrico em macrófagos de diferentes fenótipos.....	39
Figura 14. Efeito das pVEs do TA obesogênico e eutrófico no imunometabolismo de macrófagos de diferentes fenótipos.....	41
Figura 15. Efeito das VE's do tecido adiposo de indivíduo com obesidade e eutrófico, na expressão genica de Macrófagos M2.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de indivíduos adultos por categorias de peso segundo o IMC.....	15
Tabela 2. Sequência dos primers controle e de interesse.....	34
Tabela 3. Parâmetros dos voluntários incluídos no estudo.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Obesidade.....	15
1.2 Tecido adiposo	17
1.3 Macrófagos do tecido adiposo: função e impacto imunológico.	22
1.4 Vesículas extracelulares: facilitadoras da comunicação sistêmica	25
1.5 Tecido adiposo obeso e vesículas extracelulares: interações com o sistema imunológico.....	15
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	28
3. DESENHO EXPERIMENTAL	28
3.1 Delineamento experimental	28
3.2 Obtenção de vesículas extracelulares do tecido adiposo	29
3.3 Caracterização das vesículas extracelulares	30
3.4 Quantificação proteica	30
3.5 Obtenção de células mononucleares (PBMC) e cultura celular	31
3.6 Análise da internalização das vesículas extracelulares pelos macrófagos.	32
3.7 Dosagem de citocinas.	33
3.8 Dosagem de óxido nítrico.	33
3.9 Expressão gênica por RT-QPCR.	33
3.10 Análises estatísticas.	35
4. RESULTADOS	35
4.1 Obtenção de pequenas vesículas extracelulares do tecido adiposo	35

4.2 Caracterização de pequenas vesículas extracelulares do tecido adiposo	35
4.3 Pequenas vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso transportam predominantemente citocinas inflamatórias.	37
4.4 Pequenas vesículas extracelulares de indivíduos com obesidade podem estar associadas ao estado inflamatório e de estresse oxidativo característicos da obesidade.....	38
4.5 Vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso potencializam a resposta imunológica em macrófagos de diferentes fenótipos	40
4.6 Vesículas extracelulares do tecido adiposo obeso e eutrófico potencializam a expressão gênica em macrófagos fenótipos M2	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma patologia crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (TA) resultante de um balanço energético positivo, e está relacionada ao desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos do metabolismo lipídico (ASGHAR & SHEIKH, 2017; PETERSEN & SHULMAN, 2017). Entre os métodos para classificar o peso corporal, o Índice de Massa Corporal (IMC) é o mais amplamente utilizado em todo o mundo.

Calculado pela razão entre o peso e a altura ao quadrado, o IMC identifica indivíduos com valores superiores a 30 kg/m² como obesos, podendo ainda ser categorizados em três níveis de gravidade, conforme apresentado na Tabela 1 (FISCHER ET AL., 2019; LIN & LI, 2021). Embora o IMC seja amplamente reconhecido, sua principal limitação é a incapacidade de distinguir entre massa adiposa e massa muscular. Apesar dessas restrições, o IMC continua sendo uma ferramenta clínica prática e eficiente para classificar pacientes em categorias de risco e monitorar as mudanças na adiposidade ao longo do tempo (O'ROURKE, 2018; PICHÉ ET AL., 2020).

Categoria	IMC (kg/m²)
Abaixo do peso	Menor que 18,5
Peso ideal	18,5 - 24,9
Sobrepeso	25 – 29,9
Obesidade	Maior ou igual a 30
Obesidade grau I (moderada)	30 – 34,9
Obesidade grau II (severa)	35 – 39,9
Obesidade grau III (mórbida)	Maior ou igual a 40

Tabela 1. Classificação de indivíduos adultos por categorias de peso segundo o IMC.
Adaptado de: OMS, 2000.

Segundo relatório divulgado pela Federação Mundial de Obesidade (WOF) (Atlas Mundial da Obesidade 2023), 1 em cada 7 pessoas têm obesidade no mundo, e projeções futuras indicam que 1 em cada 4 pessoas (quase 2 bilhões) conviverá com obesidade, e mais da metade da população mundial, cerca de 4 bilhões, viverá com sobrepeso. No Brasil, segundo WOF, 41% dos

adultos brasileiros terão obesidade e o crescimento anual projetado de adultos com obesidade entre 2020 e 2035 é de 2,8% (BLANES, 2023).

Como uma sindemia de interesse mundial, o impacto da obesidade se estende também aos custos econômicos que aumentam significativamente promovendo altos gastos para a saúde pública. Compreender sua complexa etiologia, resultante de interações entre suscetibilidade genética, epigenética e meio ambiente, se torna um fator decisivo na sua prevenção e consequentemente interessante economicamente para a economia mundial (BARAKAT & ALMEIDA, 2021). Estudos de grande escala e longo prazo têm consistentemente demonstrado um risco elevado de morbidade e mortalidade associado a obesidade, sendo esta reconhecida como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de inúmeras patologias, incluindo diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares (DCV) (YAMADA ET AL., 2023).

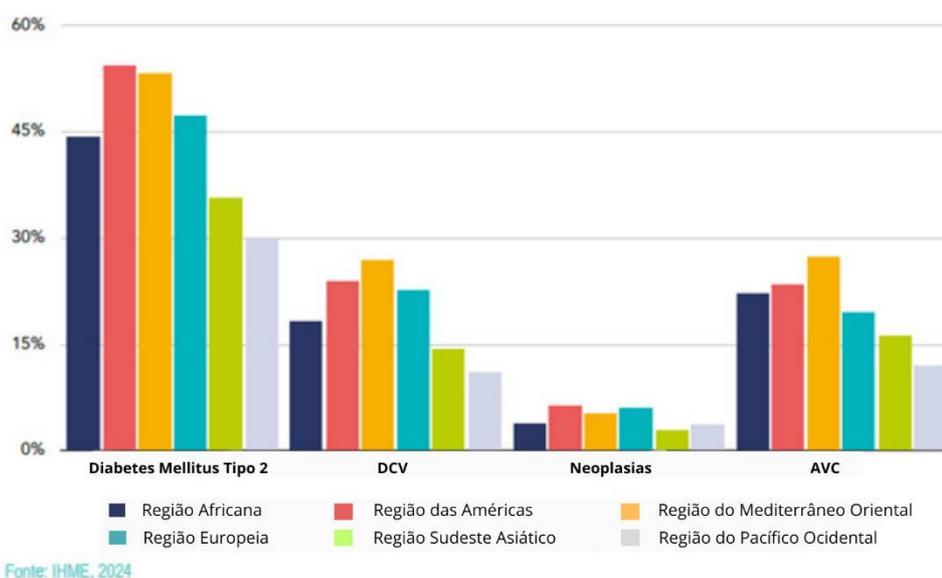


Figura 1. Mortalidade por Patologias Relacionadas ao IMC Elevado. Proporção (%) de mortes por doenças graves atribuíveis ao elevado índice de massa corporal (IMC), no ano de 20119. Adaptado de: WOF 2024.

Além de ser uma precursora de DCV, síndrome metabólica (SM) e outras comorbidades como a dislipidemia, a obesidade também é um fator central no desenvolvimento de patologias não cardiovasculares, como: doença hepática, hipertensão, hiperlipidemia, doença renal crônica, e diferentes formas de câncer,

como os de mama, cólon e próstata (POWELL-WILEY ET AL., 2021; YAMADA ET AL., 2023).

No decorrer do desenvolvimento da obesidade, além da expansão do TA corporal, que é composto por diversos tipos celulares, é possível destacar a infiltração e ativação de células do sistema imune, que nesse contexto são caracterizadas por desencadear respostas inflamatórias agudas e crônicas no tecido (DIEZ-ECHAVE ET AL., 2020; PAN ET AL., 2019; WEISBERG ET AL., 2003; YU ET AL., 2019).

1.2 TECIDO ADIPOSEO

Consagrado por muito tempo apenas como reservatório passivo para armazenamento de energia e isolamento térmico, atualmente o papel e função do TA como órgão regulador endócrino e imunológico de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos é cada vez mais evidente. (Corrêa et al., 2019; Kershaw & Flier, 2004).

Os mamíferos têm dois tipos principais de TA: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom/bege (TAM), ambos atuam como órgãos endócrinos que secretam hormônios e metabólitos importantes para a manutenção da homeostase metabólica. Apesar de possuírem semelhanças, algumas particularidades podem ser observadas como por exemplo: o TAB contém gotículas lipídicas uniloculares e é responsável por armazenar o excesso de energia, enquanto o TAM possui gotículas lipídicas multiloculares e é especializado em consumir energia. O aumento da quantidade ou atividade do TAB promove o gasto de energia e está inversamente correlacionado com o índice de massa corporal, níveis circulantes de glicose e triglicerídeos (WANG ET AL., 2024).

Nos humanos, a maior parte do TA é do tipo TAB, que é subdividido em: tecido adiposo visceral (TABv), que se acumula na cavidade peritoneal entre órgãos internos, e está associado à resistência à insulina e ao aumento do risco de diabetes tipo 2; e tecido adiposo subcutâneo (TABsc), localizado na hipoderme e está associada a um fenótipo mais sensível à insulina e a um menor risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (ALDISS ET AL., 2018; STANFORD ET AL., 2015; ZWICK ET AL., 2018). Este último pode ser composto por células

beges que expressam a proteína desacopladora 1 (UCP1), que em condições basais, tendo uma exposição prolongada ao frio ou a estimulação β 3-adrenérgica pode aumentar a capacidade termogênica. Isso por que a UCP-1 tem como função dissipar energia, desacoplando a força motriz do próton da produção de adenosina trifosfato (ATP) para gerar calor em resposta à exposição. (STANFORD ET AL., 2015; C.-H. WANG ET AL., 2024).

O TA é um órgão complexo com diversas funções no metabolismo energético, regulação endócrina e resposta inflamatória. Se caracteriza por possuir uma estrutura que inclui grande variedade de células como pré-adipócitos, adipócitos maduros, células-tronco mesenquimatosas, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e linfócitos (T e B) (DIEZ-ECHAVE ET AL., 2020). Possui funções endócrinas importantes, como: secreção de proteínas que surtem efeitos metabólicos distintos em tecidos locais ou distantes, e produção de enzimas envolvidas no metabolismo de hormônios esteroides (GUERREIRO ET AL., 2022; KERSHAW & FLIER, 2004). Tendo também, funções plásticas, metabólicas e regulatórias, que podem ser mediadas pela produção e liberação de uma ampla gama de adipocitocinas com funções pleiotrópicas e efeitos autócrinos, parácrinos e sistêmicos.(BARCHETTA ET AL., 2019; CORRÊA ET AL., 2019; KERSHAW & FLIER, 2004).

O TA secreta hormônios e adipocinas (endócrinas e parácrinas), estas são substâncias biologicamente ativas derivadas de adipócitos e produtos do metabolismo lipídico do TA (TSAI ET AL., 2020), que estão envolvidos na regulação da homeostase corporal. As adipocinas desempenham papéis cruciais nas alterações no metabolismo dos adipócitos e no manuseio de nutriente. Sendo a adiponectina e leptina fundamentais para a fisiopatologia da síndrome metabólica, enquanto a adiponectina melhora a sensibilidade à insulina, atuando principalmente no fígado e nos músculos esqueléticos, a leptina sinaliza no hipotálamo para regular a ingestão alimentar (SORISKY ET AL., 2013). O foco crescente na biogênese dessas adipocinas tem permitido identificar mecanismos reguladores dentro da maquinaria secretora dos adipócitos, que controlam a tradução e a liberação de diversos fatores. (RUTKOWSKI ET AL., 2015; SORISKY ET AL., 2013)

A literatura demonstra que a expansão hiperplásica do TA gera adipócitos funcionais e abundantes com capacidade de armazenamento lipídico, mantendo a homeostase do tecido adiposo. Isso explica, em parte, o fenótipo de obesidade metabolicamente saudável, que é caracterizado pela sensibilidade à insulina. Entretanto, quando os adipócitos são sobrecarregados com lipídios, enfrentam desafios que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse do retículo endoplasmático (ER) e ao aumento do "transbordamento" de lipídios. (RUTKOWSKI ET AL., 2015; SORISKY ET AL., 2013). Assim, o estado metabólico e redox de cada adipócito determina a composição de seu secretoma, e mudanças no perfil de secreção de adipocinas ocorrem conforme a alteração da demanda metabólica e a expansão ou redução do TA. (RUTKOWSKI ET AL., 2015).

Ao avaliar indivíduos com obesidade que já apresentam adipócitos hipertróficos, é possível observar aumento na secreção de fatores pró-inflamatórios, incluindo leptina, resistina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e ligante de quimiocina 2 (CCL2). Concomitantemente, há uma redução aparente na secreção de fatores anti-inflamatórios, como adiponectina, adipocina, interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina (IL-13), pelos adipócitos hipertróficos. Esta alteração nos secretomas dos adipócitos hipertróficos estimula a proliferação e o recrutamento de células inflamatórias, ao mesmo tempo, reduz a abundância de células imunes anti-inflamatórias (NIMPTSCH ET AL., 2019; PRISCILLA ET AL., 2024; ZHAO ET AL., 2019)

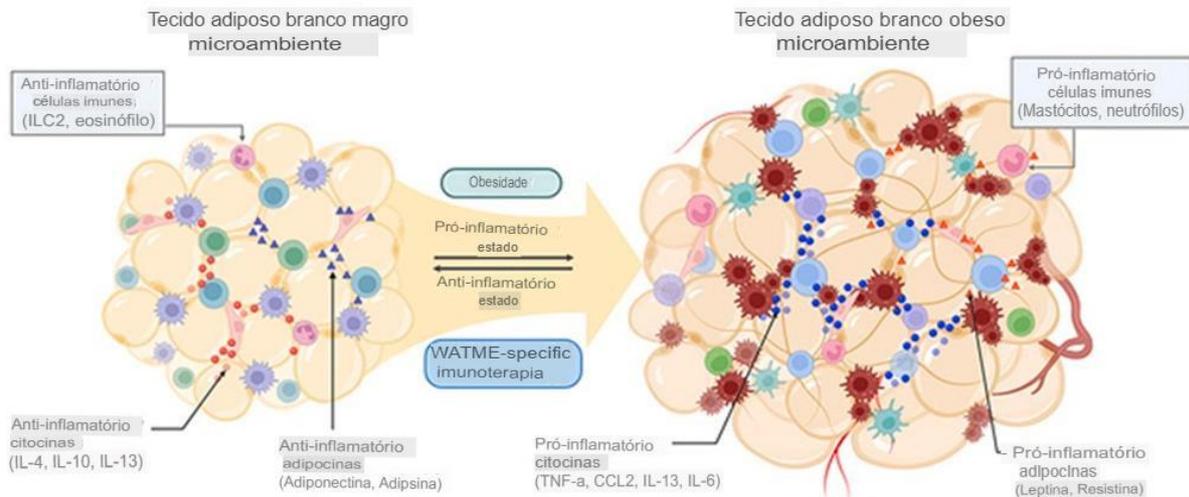


Figura 2. Microambiente do tecido adiposo branco eutrófico versus obeso. O tecido adiposo eutrófico é caracterizado pela predominância de células imunológicas com perfil anti-inflamatório, como ILC2 e eosinófilos, além da secreção de adipocinas anti-inflamatórias, como adiponectina e adiposina, e citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, que mantêm um ambiente homeostático. Em contraste, no tecido adiposo obeso, há um aumento significativo de células imunológicas pró-inflamatórias, como mastócitos e neutrófilos, acompanhado pela secreção de adipocinas pró-inflamatórias, como leptina e resistina, e de citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CCL2, resultando em um estado inflamatório crônico. Adaptado de: Priscilla et al., 2024

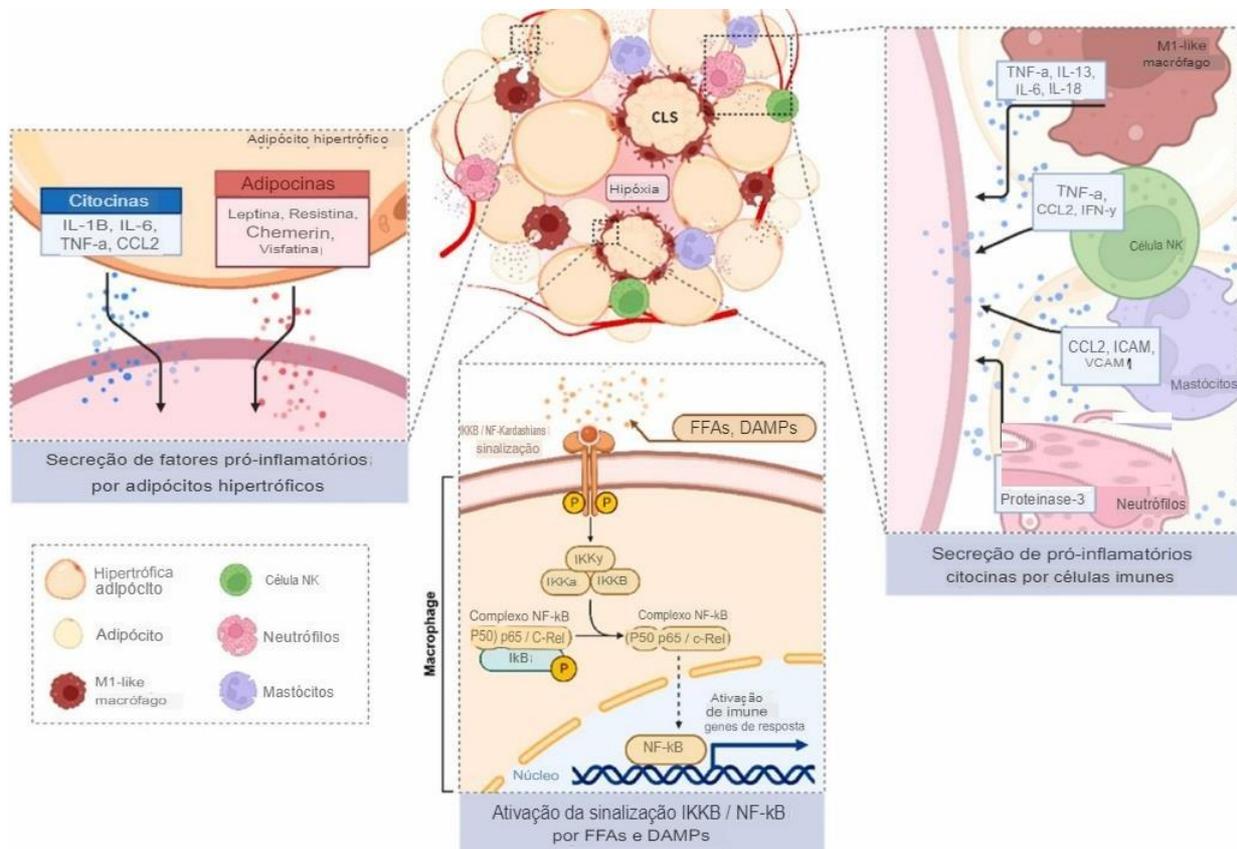


Figura 3. Impacto da obesidade no tecido adiposo. A hipertrofia dos adipócitos, desencadeada pela obesidade, promove um estado inflamatório no tecido adiposo branco, favorecendo o recrutamento de células imunológicas pró-inflamatórias. Esse ambiente inflamatório está diretamente associado ao desenvolvimento de diversas comorbidades, como doenças cardíacas coronarianas, câncer de mama e diabetes tipo 2. Em contrapartida, o tecido adiposo em indivíduos magros mantém um perfil anti-inflamatório, mediado por adipocinas e citocinas que controlam a inflamação e preservam a homeostase. Adaptado de: Priscilla et al., 2024.

Caso a capacidade de expansão do TA seja limitada, seja por um número insuficiente de pré-adipócitos ou por uma diferenciação prejudicada, o crescimento por hipertrofia dos adipócitos existentes prevalecerá, gerando células aumentadas e disfuncionais, propensas à inflamação e resistência à insulina. Esses adipócitos disfuncionais liberam quimiocinas que atraem monócitos circulantes, que se infiltram no TA e se diferenciam em macrófagos, contribuindo para a produção de citocinas pró-inflamatórias com efeitos parácrinos e endócrinos prejudiciais (RUTKOWSKI ET AL., 2015; SORISKY ET AL., 2013).

Com a expansão do TA rico em adipócitos hipertróficos, ocorre um distanciamento desses aglomerados celulares da vasculatura, promovendo um ambiente hipóxico e conseqüentemente a morte deste tipo celular. Assim na obesidade essa expansão não é proporcional a extensão do fluxo sanguíneo e ao débito cardíaco, onde a hipóxia sustenta o início e a progressão da resposta inflamatória no TA, através da baixa concentração de oxigênio (.TRAYHURN, 2013). Além disso, a hipóxia exacerba a inflamação mediada por macrófagos na obesidade juntamente com concentrações mais altas de ácidos graxos livres, sendo o estado metabólico dos adipócitos um determinante importante da produção inflamatória (ENGIN, 2017).

Tanto os macrófagos quanto os adipócitos são os locais para o metabolismo lipídico ativo e a sinalização, e como mecanismos alternativos para o desenvolvimento da inflamação. Como mecanismos alternativos incluem estresse do retículo endoplasmático e oxidativo, tendo como consequência um aumento da proporção de macrófagos de fenótipo pró inflamatório (ENGIN, 2017). Essa polarização é facilitada pela via do receptor TOLL-LIKE 4, que são ativados em resposta a padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e

ácidos graxos livres (FFAs), estimulando assim o recrutamento de outras células imunes. Os monócitos circulantes são recrutados para o local por meio de uma interação complexa envolvendo adipócitos mortos, macrófagos e células TCD8+ (PRISCILLA ET AL., 2024; WEISBERG ET AL., 2003).

1.3 MACRÓFAGOS DO TECIDO ADIPOSITO: FUNÇÃO E IMPACTO IMUNOLÓGICO.

Os macrófagos são heterogêneos e classificados com base nos padrões de expressão e função gênica, são classificados como: Ativados classicamente (M1) ou alternativamente (M2) (KRATZ ET AL., 2014). Atualmente este conceito de polarização M1/M2 foi revisado devido aos avanços no sequenciamento de última geração e na análise transcriptômica que revelaram uma heterogeneidade mais complexa (FUNES ET AL., 2018; MUSHENKOVA ET AL., 2022). Visto que os macrófagos são capazes de mudar seu fenótipo em resposta a diferentes estímulos, o fenótipo M1 é promovido por mediadores Th1 como lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- γ , sendo caracterizado pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, os mediadores Th2, por exemplo IL-4, conduzem ao fenótipo M2 de característica anti-inflamatória. Além disso, essa polarização pode levar a fenótipos intermediários entre esses dois fenótipos de extremidade aparentemente opostos.(FUNES ET AL., 2018).

Como bem definido na literatura, os macrófagos residentes do TA (TAMs) apresentam um fenótipo “misto” e adotam estados funcionais diferentes, de acordo com o ambiente que os rodeia (KRATZ ET AL., 2014). As principais fontes de macrófagos do TA são macrófagos residentes e macrófagos recrutados derivados de monócitos, sendo estes as principais células que contribuem para o aumento de TAMs na obesidade. O aumento da infiltração de macrófagos no TA forma uma estrutura semelhante a uma coroa ao redor dos adipócitos necróticos, estando fortemente correlacionado com a expressão de citocinas inflamatórias como o TNF- α , indicando que os macrófagos infiltrantes têm um efeito pró-inflamatório no tecido adiposo na obesidade (X. LI ET AL., 2023).

Já foi proposto na literatura que, após perda de peso e consequente diminuição do TA, há uma transição fenotípica dos macrófagos para um estado

anti-inflamatório (M2). Esta mudança fenotípica promove a remodelação tecidual e ajuda a mediar a inflamação a partir da expressão de fatores imunossupressores, ativação do receptor gama pelo proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e alterações de número e distribuição no TA, que parecem ser reguladas por genes da fração estromovascular (FEV) que alteram a sua expressão em resposta a alterações do IMC. (KRATZ ET AL., 2014).

Na obesidade, os monócitos circulantes são recrutados para o TA através de diversos fatores solúveis do mesmo, como: interferon-gama (IFN- γ) secretado por células natural killer (NK), CCL2 e netrina-1. Esse estímulo inflamatório estabelece um ciclo de feedback positivo que contribui para o desenvolvimento de inflamação sistêmica crônica, através de uma sequência de estímulos resultantes da interação de macrófagos do tipo M1 e adipócitos. Em que o aumento da morte de adipócitos, consequência da interação citada, leva à secreção elevada de DAMPs e FFAs, desencadeando subsequentemente a ativação da via fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B ativado regula positivamente a expressão de CCL2, IL-6, interleucina-12 (IL-12), interleucina1 beta (IL-1 β), interleucina-18 (IL-18) e TNF- α (KRATZ ET AL., 2014; PRISCILLA ET AL., 2024).

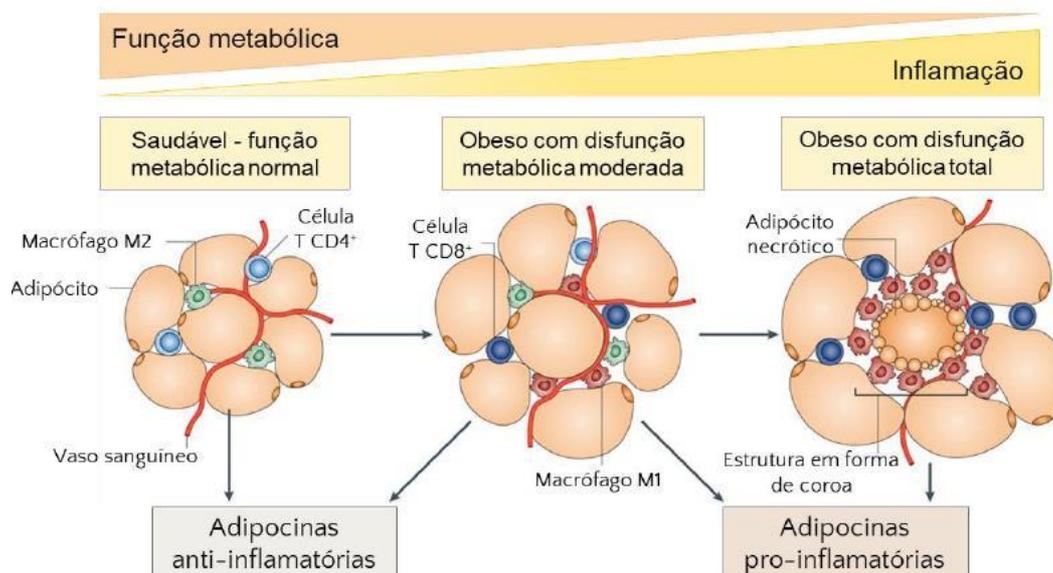


Figura 4. Modulação patológica do tecido adiposo. Com a expansão descontrolada do tecido adiposo, os adipócitos sofrem hipertrofia, o que resulta em vascularização deficiente, hipóxia e fibrose. Esse processo é acompanhado pelo recrutamento de monócitos e pela mudança no perfil

fenotípico dos macrófagos residentes, de M2 para M1. Além disso, há alterações na população de linfócitos T. Como consequência, o tecido adiposo obeso passa a secretar fatores pró-inflamatórios, contribuindo para a disfunção metabólica. Adaptado de: OCHI, 2011.

Fatores solúveis secretados pelo ambiente do TA sugerem ser determinantes para a polarização dos macrófagos. Porém, os mecanismos subjacentes desta comunicação precisam ser compreendidos de forma mais ampla, tendo em vista que a obesidade pode alterar o microambiente tecidual e consequentemente afetar a função e a resposta macrofágica (WCULEK ET AL., 2022).

A literatura define flexibilidade metabólica como capacidade do organismo em utilizar diferentes substratos de maneira predominante de acordo com sua disponibilidade. Ao avaliar por esse aspecto o TA, observamos uma responsividade para estímulos anabólicos (insulina) ou catabólicos (catecolaminas), expandindo (armazenando) e contraindo (mobilizando) os macronutrientes, respectivamente. (SCHWEITZER ET AL., 2021)

A ativação de macrófagos confere função e plasticidade heteróclita conforme o microambiente e estímulo. Nos macrófagos ativados por LPS e IFN- γ (macrófagos M1), há predominância da glicólise e produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Fazem parte do metabolismo de macrófagos ativados por IL-4 (macrófagos M2) a fosforilação oxidativa, oxidação de ácidos graxos, propriedades anti-inflamatórias e maior atividade de fagocitose contra patógenos. Essas alterações metabólicas e imunológicas em resposta à natureza do estímulo se mostram determinantes nas funções efetoras dos macrófagos (LIAN ET AL., 2022).

Reconhecendo o papel crucial do TA na função metabólica, e considerando que a reprogramação de macrófagos é alcançada através da indução de alterações de pontos específicos de rotas metabólicas e imunológicas; podendo esta reprogramação ser desencadeada por comunicação celular (ZHANG, Yuan, LIU, et al., 2019). Nesse contexto, as vesículas extracelulares (VEs) derivadas do TA têm recebido destaque devido às suas potentes atividades biológicas, tanto autócrinas quanto parácrinas. Elas são reconhecidas como importantes fatores na regulação metabólica, exercendo

fortes efeitos na sinalização e regulação do metabolismo, tanto local quanto sistêmico.(CREWE, 2022B; SUNG ET AL., 2020)

1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES: FACILITADORAS DA COMUNICAÇÃO SISTÊMICA

Inicialmente acreditava-se que a secreção de VEs era restrita a reticulócitos e plaquetas, sendo o primeiro um mecanismo para eliminar compostos desnecessários com pouca relevância biológica, e para as plaquetas uma forma de promover atividade pró coagulante .(RATAJCZAK & RATAJCZAK, 2020). No entanto, atualmente, sabe-se que as VEs têm uma função muito mais complexa, sendo fundamentais na comunicação intercelular e desempenhando um papel crucial ao transportar e entregar biomoléculas como: proteínas, RNAs mensageiros (mRNAs), DNA e RNAs não codificantes (ncRNAs); para células receptoras em diversos contextos. Além de atuarem como veículos de sinalização em processos celulares homeostáticos, as VEs também estão envolvidas na patogênese de diversas doenças, incluindo infecções, distúrbios neurodegenerativos, doenças cardiovasculares, obesidade e câncer.(LI ET AL., 2019; SUNG ET AL., 2020; VAN NIEL ET AL., 2018)

As VEs são classificadas com base em seu tamanho, mecanismo de biogênese, carga e densidade, sendo divididas em corpos apoptóticos, ectossomos (micropartículas/microvesículas) e pequenas vesículas extracelulares (pVEs), anteriormente nomeadas como exossomos. As pVEs são vesículas nanométricas, com diâmetro de 30–150nm e formadas por várias etapas, incluindo a geração de endossomos, o brotamento interno da membrana endossômica durante a maturação dos endossomos multivesiculares, resultando na biogênese de corpos multivesiculares, que são secretados após a fusão com a membrana plasmática, liberando as pVEs para fora das células (LI ET AL., 2019; SUNG ET AL., 2020; VAN NIEL ET AL., 2018)

Atualmente, sabe-se que a secreção de VEs ocorre em diversos tipos celulares, e suas implicações na comunicação intercelular, tanto em estados normais quanto patológicos, estão amplamente documentadas (LI ET AL., 2019; SUNG ET AL., 2020; VAN NIEL ET AL., 2018). Uma vez liberadas no espaço

extracelular, as VEs podem alcançar células receptoras e entregar seus conteúdos, provocando respostas funcionais e promovendo mudanças fenotípicas que influenciam o estado fisiológico ou patológico dessas células. A comunicação intercelular mediada por VEs envolve a atracção na membrana plasmática da célula-alvo, seguida pela activação de receptores de superfície e sinalização, internalização da VE (endocitose) ou fusão com a célula receptora. A especificidade dessa interacção pode ser determinada por interacções específicas entre as proteínas presentes na superfície das VEs e os receptores da membrana plasmática das células-alvo (LI ET AL., 2019; VAN NIEL ET AL., 2018).

As pVEs originadas do TA formam uma população altamente heterogênea, composta predominantemente por vesículas de adipócitos, porém, são encontradas também aquelas derivadas de células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e outras células imunes. Essas pVEs são envolvidas externamente por fosfolipídios e carregam diversas moléculas bioativas, incluindo microRNAs (miRNAs), RNA mensageiro (mRNAs), ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas, lipídios e metabólitos da célula de origem. (KWAN ET AL., 2021)

A capacidade que as pVEs possuem de transferir uma ampla gama de informações para células vizinhas ou distantes, exercendo potentes efeitos de sinalização nas células receptoras, se dá através de tetraspaninas. Estas desempenham um papel potencial na selecção de carga das vesículas intraluminais e na biogênese dessas estruturas. O acúmulo dessas proteínas como: CD9, CD63 e CD81; são amplamente utilizadas como marcadores de pVEs (CREWE, 2022B; MATHIEU ET AL., 2021; SUNG ET AL., 2020).

O impacto da obesidade no conteúdo dos exossomos derivados de adipócitos foi reconhecido. Sabe-se que o efeito dos exossomos nas células receptoras dificilmente é atribuído a um conteúdo específico, porque as células receptoras absorvem a carga sem processo seletivo de conteúdo (KWAN ET AL., 2021). O estudo Couch et al., 2021 demonstrou que citocinas podem ser liberadas por meio de VEs, e que estas derivadas de células imunológicas desempenham um papel crucial na função do sistema imunológico (COUCH ET AL., 2021). Pesquisas pioneiras mostraram que VEs isolados de explantes de TA humano e de camundongos através de adipócitos imortalizados induziram

inflamação e resistência à insulina em miócitos e hepatócitos, esses efeitos foram mais evidentes quando o TA foi proveniente de indivíduos obesos.(CREWE, 2022B)

1.5 TECIDO ADIPOSEO OBESO E VESÍCULAS EXTRACELULARES: INTERAÇÕES COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO.

Sabendo que as pVEs não apenas carregam sinais inflamatórios, mas também podem influenciar diretamente na função das células imunológicas, potencializando ou modulando as respostas inflamatórias em indivíduos obesos. Explorar a comunicação entre pVEs e macrófagos, oferece uma nova perspectiva sobre como a inflamação crônica de baixo grau e a obesidade se entrelaçam, podendo revelar novos alvos terapêuticos e estratégias para combater as complicações metabólicas associadas à obesidade.

Estudos referenciados por Sorisky et al., 2013, demonstraram que fatores secretados por macrófagos derivados de monócitos humanos e ativados por LPS inibem a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongos e humanos. Fatores como TNF- α e IL-1 β foram propostos como contribuintes da atividade antiadipogênica desses macrófagos. Assim, a fisiologia local do adipócito pode ter efeitos sistêmicos, com potenciais consequências benéficas ou prejudiciais (SORISKY ET AL., 2013).

Sabendo que a reprogramação de macrófagos pode ser alcançada por meio da indução de alterações em vias metabólicas e imunológicas específicas, buscamos investigar a resposta de macrófagos ao tratamento com pVEs de TA de doadores com obesidade e de doadores eutróficos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender o papel das vesículas extracelulares provenientes do tecido adiposo de indivíduos com obesidade ou eutrofia em macrófagos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o conteúdo de mediadores inflamatórios nas vesículas extracelulares.
- Comparar a produção de mediadores inflamatórios nos macrófagos tratados com vesículas extracelulares do tecido adiposo de indivíduo com obesidade e eutrofia.
- Avaliar os efeitos in vitro das vesículas extracelulares provenientes do tecido adiposo na resposta imunológica dos macrófagos

3. DESENHO EXPERIMENTAL

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do presente estudo elaboramos o delineamento experimental representado na Figura 5. Amostras humanas de tecido adiposo (obeso e eutrófico) foram coletadas para obtenção de pVEs. Em seguida foi realizada a caracterização dessas vesículas através do tamanho e capacidade de internalização nas células. Macrófagos polarizados ou não, foram tratadas com as respectivas pVEs. O efeito das pVEs do TA nos macrófagos foi avaliado através da secreção de mediadores inflamatórios.

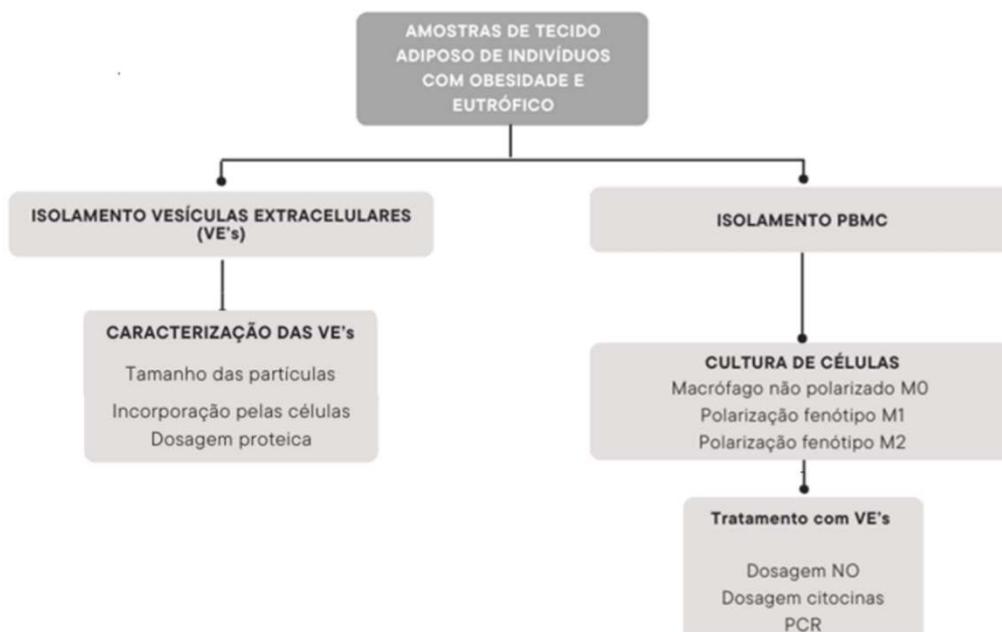


Figura 5. Fluxograma desenho experimental proposto. De modo geral, isolamos as vesículas extracelulares do tecido adiposo de amostras humanas, tanto de indivíduos obesos quanto

eutróficos, e realizamos a caracterização dessas vesículas com o objetivo de avaliar a secreção de mediadores inflamatórios.

3.2 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO

O projeto foi submetido (número: 85521518.4.0000.5147) e aprovado (parecer: 5.321.687) pelo Comitê de Ética- Plataforma Brasil. As pequenas vesículas extracelulares (pVE's) foram isoladas do TA de amostras humanas, que foram coletadas de voluntários com obesidade, submetidos a cirurgia bariátrica (IMC>35) e voluntários eutróficos (IMC<25) submetidos a cirurgias abdominais. Para o processamento das amostras, o TA foi fragmentado em pequenos pedaços com auxílio de pinça e bisturi. Os fragmentos de tecido foram cultivados em placas de Petri (Sarsted, Alemanha) em meio DMEM, suplementado com penicilina, estreptomicina (100 µg/mL) mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio condicionado da cultura de tecido foi coletado para o isolamento das pVE's pelo método de centrifugação e ultracentrifugação. O meio condicionado foi submetido a 3 etapas de centrifugação, onde o sobrenadante de cada etapa passou para a seguinte (300g por 15 minutos, 2000g por 15 minutos e a 20000g por 45 minutos) todas a 4°C. Sobrenadante proveniente desta última centrifugação foi então filtrado (0.22 mm) e ultracentrifugado a 100000g, por 70 minutos a 4°C. O pellet resultante foi ressuscitado em PBS-1X (tampão fosfato salina), filtrado em 0.22 mm, e ultracentrifugado novamente sob as mesmas condições. Finalmente o pellet obtido foi ressuscitado em aproximadamente 100 microlitros de PBS-1X (filtrado), aliqotado em microtubos e congelado a -80°C. Cada amostra de pVE's foi descongelada por no máximo 2 vezes.

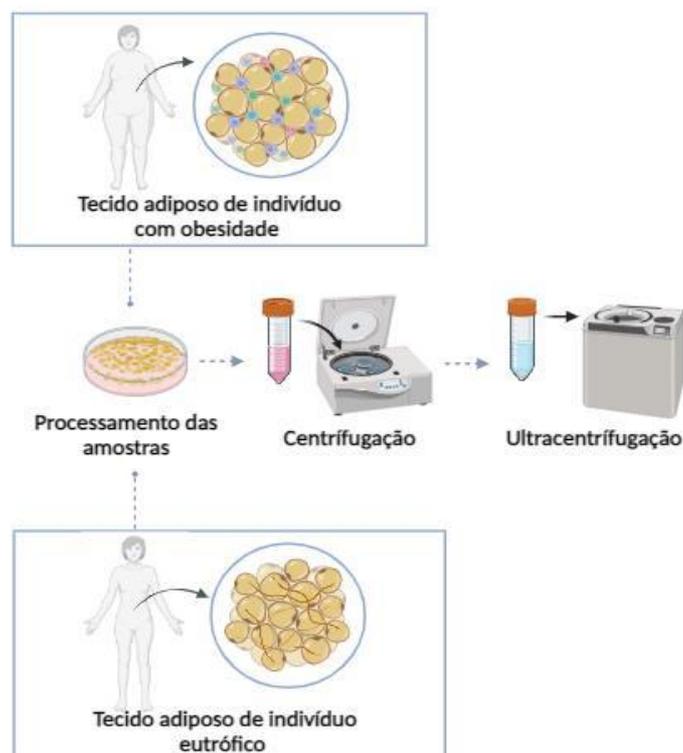


Figura 6. Protocolo de obtenção de pVEs tecido adiposo. O meio de cultura do tecido adiposo foi coletado após 24 horas e iniciou-se o processo de obtenção das pVEs pelo método de ultracentrifugação. Fonte: Autor

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Análise do tamanho das VEs por espalhamento dinâmico da luz. O diâmetro das partículas foi analisado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS – do inglês, Dynamic Light Scattering) que permite determinar o perfil da distribuição de tamanhos das partículas. Os isolados de pVEs foram diluídos 250 vezes em PBS-1X filtrado (0.22 µm). O sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro para medição do diâmetro no equipamento Zetasizer Nano (Malvern).

3.4 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Após a obtenção das pVEs, uma alíquota da amostra foi destinada à dosagem do conteúdo proteico com a utilização do kit Micro BCA Protein Assay

(Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

3.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMC) E CULTURA CELULAR

Amostras de sangue periférico (20mL) foram coletados de doadores voluntários eutróficos. O sangue total coletado foi adicionado gentilmente sobre a camada de FICOL (Ficoll® Paque Plus), utilizando uma pipeta Pasteur estéril de plástico sem que as duas frações se misturassem. Amostra foi centrifugada a 400 x g por 30 min a temperatura ambiente, parada sem freio, formando o gradiente: hemácias + polimorfonucleares (PMN) no fundo, FICOL acima das hemácias, células mononucleares (PBMC) acima do FICOL, e plasma no topo. Amostra PBMC resultante da centrifugação foi transferida para um novo tubo, e este foi completado com PBS-1X estéril para lavar as células. Nova centrifugação a 500 x g 4 °C 5 min, foi realizada para precipitar os PBMC.

As amostras foram ressuspensas em meio suplementado (RPMI, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% penicilina, estreptomicina (100 µg/mL)) e plaqueadas em placas de 48 poços nas densidades de de 2×10^5 /mL em meio RPMI suplementado com penicilina, estreptomicina (100 µg/mL) e SFB depletado de pVE's e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Após 7 dias, os macrófagos foram lavados com PBS-1X.

Para obtenção de macrófagos fenótipo M1, macrófagos M0 foram diferenciados em macrófagos M1 na presença de 25 ng/mL de GM-CSF, 50 ng/mL de IFN-γ e 100 ng/mL de LPS por 48 h. Macrófagos M2 foram obtidos cultivando macrófagos M0 na presença de 50 ng/mL de M-CSF e 20 ng/mL de IL-4 por 48 h. Macrófagos M0 foram gerados a partir de monócitos conforme descrito para macrófagos M1 e M2, mas sem a adição de fatores de crescimento ou citocinas. Para todos os experimentos realizados, foi utilizado tratamento na concentração de 25µg/mL de pVE's TA obesogênico e eutrófico.

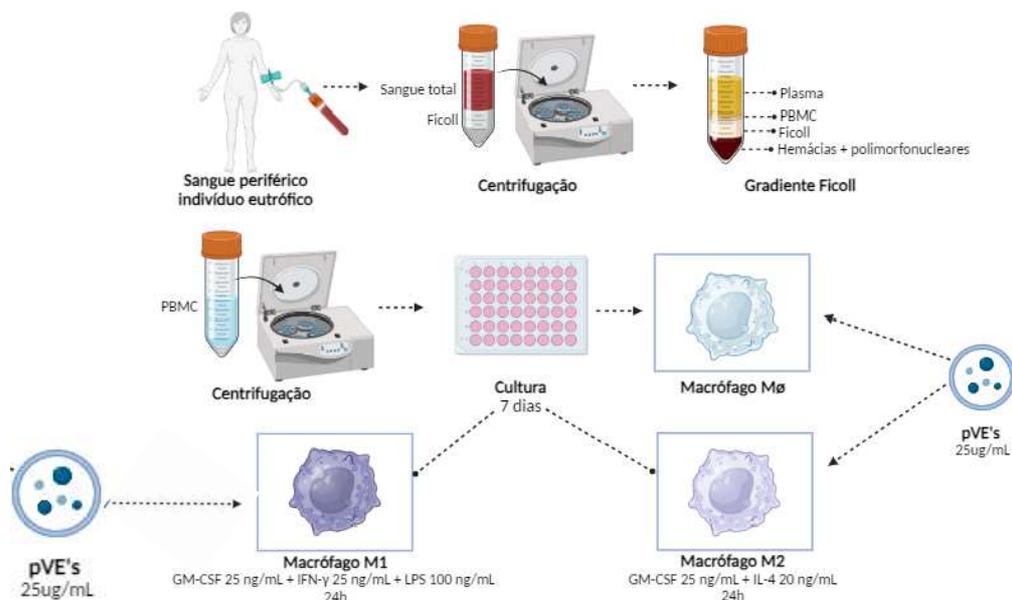


Figura 7. Protocolo de obtenção de PBMC e diferenciação em macrófagos. As amostras de PBMC, obtidas por centrifugação, foram utilizadas para a diferenciação de macrófagos nos fenótipos M0, M1 e M2. Os tratamentos foram realizados com vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obesogênico e eutrófico, na concentração de 25 µg/mL. Fonte: Autor

3.6 ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PELOS MACRÓFAGOS.

Para visualização da internalização das VE's, as células foram previamente plaqueadas em placas de 24 poços, contendo uma lamínula de vidro em cada poço, e após 24h iniciou-se a marcação. Primeiramente, amostras de pVE's do TA obeso ou do meio condicionado livre de pVE's, foram diluídas em PBS-1X para concentração proteica final de 25µg/ml e volume final de 500µl. As amostras foram então depositadas em tubos de ultracentrífuga e 3µl de PKH26 (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados em cada um deles. Um tubo adicional contendo apenas PBS-1X mais 3µl de PKH26 foi utilizado como controle da marcação. Após 3 minutos de incubação, acrescentou-se em cada tubo 1mL de PBS-1X suplementado com 5% de SFB livre de pVE's. As amostras foram então preenchidas com DMEM e ultracentrifugadas a 110000g por 1h a 4°C para lavagem do excesso de marcação. Após este processo, o meio foi retirado e o pellet final contendo cerca de 100µl foi utilizado para tratamento das células. Macrófagos foram então tratadas com 25µl do respectivo grupo amostral

marcado com PKH26. Após 4 horas de tratamento, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS-1X e as células fixadas em paraformaldeído 4%. As células foram lavadas 2 vezes com PBS-1X e então incubadas com Hoechst (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição 1:2000 por 5 minutos no escuro. As células foram então lavadas por 3 vezes com PBS-1X e as lâminas foram preparadas com meio de montagem para visualização em microscópio confocal Leica DMI6000CS.

3.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços nas densidades de 2×10^5 células por poço. Após 7 dias do plaqueamento os poços foram lavados com PBS-1X e um novo meio contendo os respectivos tratamentos foi adicionado. Após 24 do tratamento, o sobrenadante de cada poço foi retirado e mantido a -80°C para posterior ensaio de ELISA. Foram utilizados $50\mu\text{l}$ de amostras sem diluição, para dosagem através de ensaio imunoenzimático de captura (ELISA), de acordo com especificações do fabricante (R&D systems).

3.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

Para a dosagem indireta de NO, foi realizado o protocolo de reação de Griess (GREEN ET AL., 1981). As amostras foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços. A curva padrão foi realizada como solução NO_2 ($200\mu\text{M}$) em diluições seriadas de 1:2. Foram adicionados $100\mu\text{L}$ da solução de Griess (v/v de 0,1% NEED e 1% SULFANAMIDA), seguindo-se incubação por 5 minutos, a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa, em 540nm.

3.9 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços nas densidades de 2×10^5 células por poço. Após 7 dias do plaqueamento, os poços foram lavados com PBS-1X e um novo meio contendo os respectivos tratamentos foi adicionado. Após 24h de tratamento, os poços foram lavados 2 vezes com PBS-1X. A extração de RNA foi realizada por Kit para extração e purificação de RNA

com colunas, de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80°C . Posteriormente, a quantidade e qualidade de RNA foi estimada através do espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a síntese de cDNA, utilizamos o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, EUA) e após seguir o protocolo de acordo com o fabricante os tubos contendo cDNA foram armazenados a -20°C . Após a síntese do cDNA, realizou-se a PCR. As reações foram feitas no volume final de $10\mu\text{L}$, dos quais $2\mu\text{L}$ da mostra cDNA e $8\mu\text{L}$ da solução contendo $5\mu\text{L}$ Syber Green Master Mix (Applied Biosystems), iniciadores senso ($0,2\mu\text{L}$) e anti-senso ($0,2\mu\text{L}$) de cada gene, na concentração de $10\mu\text{M}$ e água extra pura ($2,1\mu\text{L}$). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado através do equipamento Step One Plus Real-time RT-PCR System. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na Tabela 2.

Para a análise dos resultados das reações de PCR em tempo real foi utilizada a metodologia $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, em que treshold cycle (Ct) é o número de ciclos em que o sinal de fluorescência da reação ultrapassa o threshold (nível de sinal que reflete um aumento significativo sobre o sinal inicial). ΔCt é a diferença entre o Ct do gene de interesse (CTalvo) e o CT do gene referência endógena (para todas as reações nós utilizamos a Actina). Já a diferença entre a as variações de CTalvo e do CTreferência endógena é denominada $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Gene	Foward	Reverse
ARG-1	ACGGAAGAATCAGCCTGGTG	GTCCACGTCTCTCAAGCCAA
CCL-2	AGCAGCAAGTGTCCTCAAGA	GGTGTCTGGGGAAAGCTAGG
IL-1 β	TCGCCAGTGAAATGATGGCT	AGATTCGTAGCTGGATGCCG
STAT-6	CCGAGGTGAGGGGTTGC	ACTAGCCAAGTTGCAGCAGAA
TNF- α	GACAAGCCTGTAGCCCATGT	GGAGGTTGACCTTGGTCTGG
IL-6	CCACCGGGAACGAAAGAGAA	GAGAAGGCAACTGGACCGAA

Tabela 2. Sequência dos primers controle e de interesse

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). Para verificação de significância estatística dos experimentos com mais de dois grupos experimentais e variáveis, foi utilizado o teste OneWay ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni. Para as análises estatísticas dos experimentos com mais de dois grupos experimentais e mais de uma variável foi aplicado TwoWay ANOVA seguido dos pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises foram considerados significativos somente aqueles resultados que apresentaram $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DE PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO

Para obtenção das pVEs, amostras de TA foram coletadas de voluntários com obesidade ($n=8$) submetidos a cirurgia bariátrica e voluntários em eutrofia submetidos a cirurgias abdominais ($n=2$). Os indivíduos obesos apresentavam IMC médio de 42,65, sendo majoritariamente do sexo feminino e idade média de 46 anos. Enquanto os voluntários eutróficos tinham IMC médio de 18,90, sexo masculino e idade média de 55 anos.

Grupo (N)	Idade (média)	IMC (média)	SEXO
Obeso (8)	46	42,65	F e M
Eutrófico (2)	55	22,9	M

Tabela 3. Parâmetros dos voluntários incluídos no estudo. IMC: índice de massa corporal, F: feminino, M: masculino. Valores representam a média.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO

As pVEs foram isoladas utilizando o método de ultracentrifugação, conforme descrito previamente. Posteriormente, elas foram caracterizadas em termos de tamanho por meio de análises utilizando o Zetasizer. Os resultados indicaram que o diâmetro médio das partículas isoladas do tecido adiposo foi de 268 nm. (Figura 8).

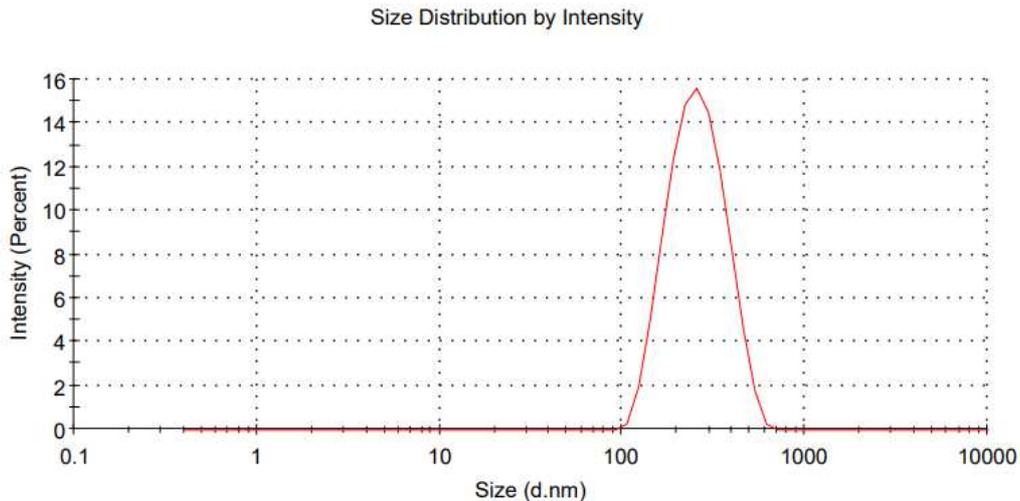


Figura 8. Distribuição do tamanho das pVEs derivadas do tecido adiposo. Gráfico da distribuição do tamanho das partículas encontradas nas amostras de pVEs do tecido adiposo.

Seguindo na caracterização das pVEs, realizamos uma análise detalhada utilizando microscopia eletrônica. As imagens obtidas revelam vesículas isoladas do tecido adiposo obeso com um diâmetro aproximado de 100 nm, permitindo a observação de suas características morfológicas e estruturais específicas. (Figura 9).

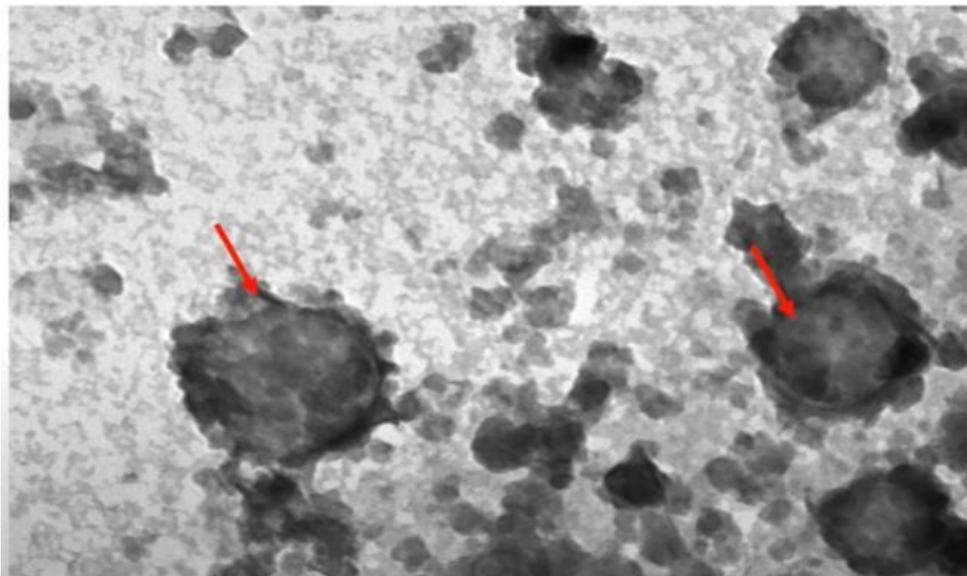


Figura 9. Microscopia eletrônica de pequenas vesículas extracelulares isoladas de TA obeso. 100 nm.

Por fim observamos a incorporação das pVEs pelos macrófagos. Para isso, foi utilizado o marcador lipofílico PKH26 para corar as pVEs do TA obeso e aquisição de imagens em microscópio confocal. Após 4 horas do tratamento com estas vesículas, é possível observar que o macrófago foi capaz de internalizá-las (Figura 10).

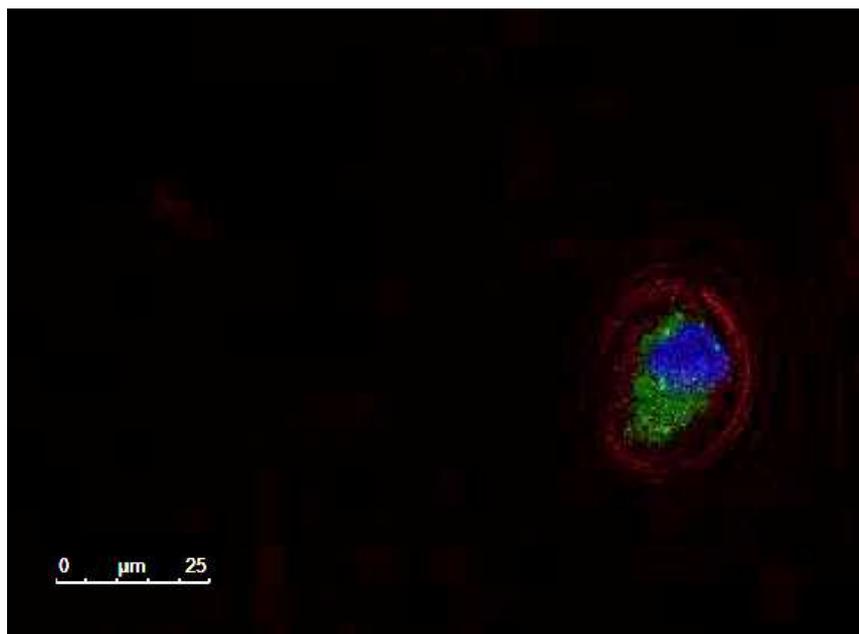


Figura 10. Internalização de VEs do TA obeso pelo macrófago. Após 4 horas de tratamento das células a internalização das VEs previamente coradas com PKH 26 (em verde) foi analisada através de microscopia confocal. O núcleo celular foi corado com Hoechst (em azul) e a actina com Faloidina (em vermelho). Imagens representativa de 1 experimento.

4.3 PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO TRANSPORTAM PREDOMINANTEMENTE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.

Após a caracterização das pVEs, investigamos se elas seriam capazes de transportar níveis significativos de mediadores inflamatórios, tendo a capacidade de carregar citocinas para outros órgãos e tecidos, potencialmente amplificando a resposta inflamatória sistêmica frequentemente observada em indivíduos obesos. Foi realizada análise através da dosagem de mediadores associados a vias de alterações metabólicas bem descritas na literatura. Avaliamos os níveis de: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α e MCP-1, a partir do sobrenadante de pVEs TA obeso (25 μ g/mL) que foram plaqueados em meio condicionado sem células por 24h.

Não foi encontrado níveis elevados do mediador clássico IL-1, que é bem descrito na literatura por sua participação em vias metabólicas e imunológicas importantes. No entanto, é possível observar distinções em outros mediadores, como IL-8, MCP-1 e TGF- β , sugerindo que esses podem ter um papel central na perpetuação da inflamação e no impacto potencial na homeostase sistêmica,

incluindo resistência à insulina. Além disso, confirmamos a baixa concentração de mediadores como IL-10 e TNF- α , o que reforça o cenário de inflamação crônica observado.

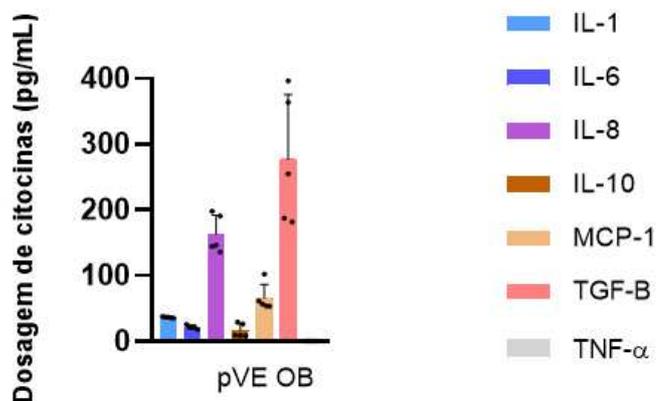


Figura 11. Análise da capacidade de pequenas vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obesogênico transportarem mediadores inflamatórios. pVEs do tecido adiposo de indivíduos obesos (25 $\mu\text{g/mL}$) foram incubadas em meio condicionado sem células por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e os níveis dos mediadores inflamatórios foram analisados através dos níveis de concentração de: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α e MCP-1.

4.4 PEQUENAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE PODEM ESTAR ASSOCIADAS AO ESTADO INFLAMATÓRIO E DE ESTRESSE OXIDATIVO CARACTERÍSTICOS DA OBESIDADE.

Com base na análise anterior, que mostrou que as pVEs derivadas do TA obesogênico possivelmente podem transportar citocinas para outros órgãos e tecidos, potencialmente amplificando a resposta inflamatória sistêmica em indivíduos obesos, investigamos também os níveis de óxido nítrico (NO) nessas vesículas. Consideramos que o aumento de NO pode estar associado às características inflamatórias da obesidade, reforçando a ideia de que esse aumento não é casual, sugerindo que o NO pode servir como um marcador de inflamação ou estresse metabólico nas vesículas extracelulares associadas à obesidade.

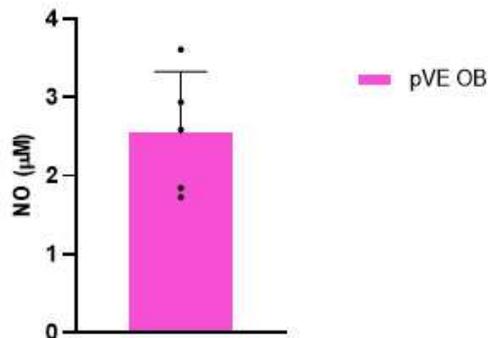


Figura 12. Análise dos níveis de NO em pequenas vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obesogênico. pVEs do tecido adiposo de indivíduos obesos (25 µg/mL) foram incubadas em meio condicionado sem células por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e os níveis de NO foram analisados através dos níveis de concentração.

Sabendo que NO é um mediador crucial na resposta inflamatória e no estresse metabólico, investigamos como macrófagos com diferentes fenótipos – M0 (não polarizado), M1 e M2 – respondem ao tratamento com pVEs derivadas do TA obesogênico. O gráfico demonstra que os macrófagos M0 apresentam um aumento significativo nos níveis de NO quando tratados com pVEs do TA obesogênico, ao passo que não observamos alterações semelhantes nos macrófagos M1 e M2.

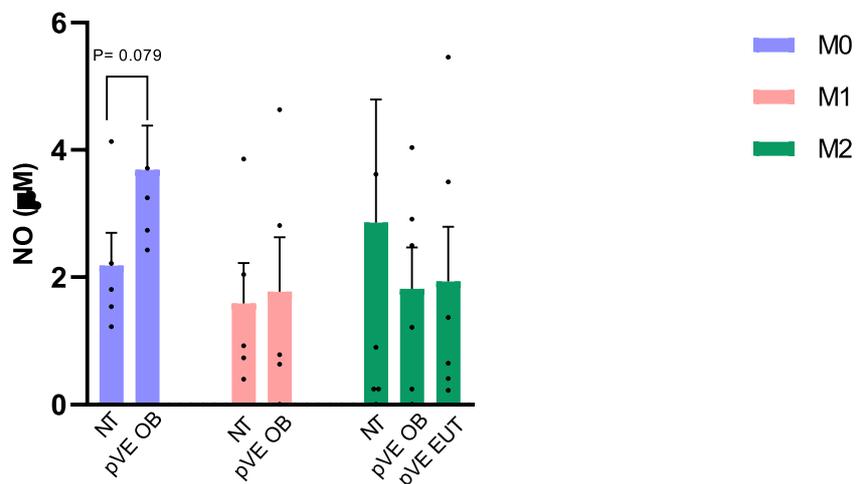


Figura 13. Efeito das pVEs do TA obesogênico na produção de óxido nítrico em macrófagos de diferentes fenótipos. Macrófagos não polarizados (MØ) e M1, foram tratados com 25µg/mL de pVE's TA indivíduos com obesidade. Macrófagos fenótipo M2 foram tratados com 25µg/mL pVE's TA indivíduos com obesidade e 25µg/mL pVE's TA indivíduos eutrofia. Após 24h o sobrenadante foi recolhido e os níveis de NO foram analisados através dos níveis de

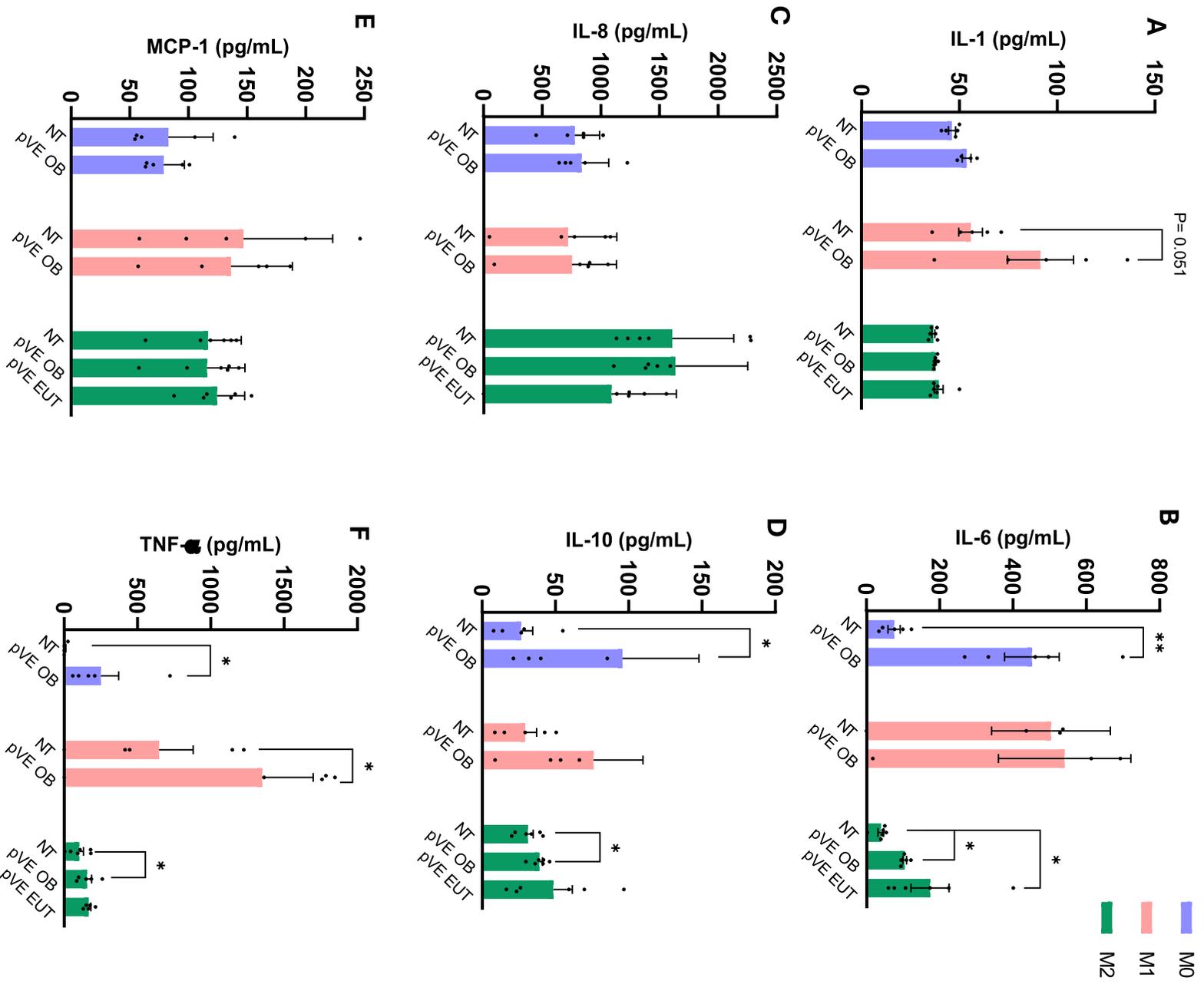
concentração. Como controle (NT) utilizamos células não tratadas. * $P < 0,05$ comparando-se aos respectivos grupos.

4.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO POTENCIALIZAM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM MACRÓFAGOS DE DIFERENTES FENÓTIPOS

Após a caracterização das pVEs, investigamos sua capacidade de influenciar a plasticidade e alteração do fenótipo dos macrófagos MØ, M1 e M2. Para isso, analisamos a dosagem de mediadores associados a vias imunometabólicas bem descritas na literatura, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α e MCP-1, no sobrenadante de células não tratadas, tratadas com pVEs do tecido adiposo obesogênico e do tecido adiposo eutrófico.

Como evidenciado anteriormente, as pVEs do tecido adiposo carregam níveis consideráveis de mediadores (FIGURA 14 A, E e F). Ao comparar os macrófagos tratados com pVEs do tecido adiposo de indivíduos obesos com aqueles tratados com pVEs de indivíduos eutróficos, observamos que as pVEs do tecido adiposo possuem diferentes perfis de mediadores dependendo de sua origem

Macrófagos Não-Polarizados (MØ): A estimulação com pVEs do TA de indivíduos obesos resultou em um aumento significativo nas interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em comparação com o controle negativo (NT) (FIGURA 14 A, B, D e F), sustentando a hipótese de que as pVEs influenciam a plasticidade dos macrófagos. **Macrófagos Polarizados M1:** A estimulação com pVEs do tecido adiposo de indivíduos obesos promoveu um aumento significativo na citocina TNF (FIGURA 14F) em comparação com o controle negativo (NT). **Macrófagos Polarizados M2:** A estimulação com pVEs do TA de indivíduos eutróficos levou a um aumento significativo na interleucina IL-6 em comparação com os controles não tratados (NT) e macrófagos M2 tratados com pVEs de TA de indivíduos obesos e eutróficos (FIGURA 14 B), e aumento significativo da interleucina IL-10 em relação ao macrófago M2 estimulados com pVEs TA de indivíduos obesos com controle negativo (NT) (FIGURA 14 D), reforçando a hipótese de que as pVEs influenciam a plasticidade dos macrófagos.



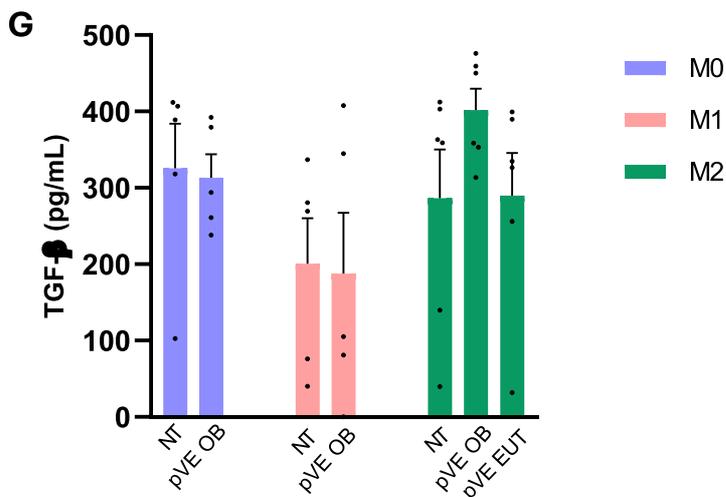


Figura 14. Efeito das pVEs do TA obesogênico e eutrófico no imunometabolismo de macrófagos de diferentes fenótipos. Macrófagos não polarizados (MØ) e M1, foram tratados com 25µg/mL de pVE's TA indivíduos com obesidade. Macrófagos fenótipo M2 foram tratados com 25µg/mL pVE's TA indivíduos com obesidade e 25µg/mL pVE's TA indivíduos eutrofia. Após 24h o sobrenadante foi recolhido e os níveis dos mediadores inflamatórios foram analisados através dos níveis de concentração de: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TGF-β, TNF-α e MCP-1. *P< 0,05 comparando-se aos respectivos grupos.

4.6 VESÍCULAS EXTRACELULARES DO TECIDO ADIPOSEO OBESO E EUTRÓFICO POTENCIALIZAM A EXPRESSÃO GÊNICA EM MACRÓFAGOS FENÓTIPOS M2.

Dado que as pVEs demonstraram a capacidade de modular a secreção de mediadores inflamatórios em macrófagos de diferentes fenótipos, buscamos entender se biomoléculas secretadas pelo tecido adiposo obeso e eutrófico poderiam também alterar a expressão gênica em células-alvo. Assim, avaliamos se o tratamento com pVEs do tecido adiposo poderia modificar a expressão gênica dos macrófagos fenótipo M2, verificando se as pVEs do tecido adiposo obeso direcionariam esses macrófagos para uma expressão de genes inflamatórios ou se as pVEs do tecido adiposo eutrófico reforçariam o fenótipo anti-inflamatório característico do macrófago M2.

Os resultados mostraram que as pVEs do tecido adiposo obeso remodelaram significativamente a expressão do gene CCL-2, um importante mediador inflamatório, enquanto as VE's do tecido adiposo eutrófico aumentaram a expressão do gene IL-1 β , sugerindo perfis distintos de regulação gênica dependendo da origem das pVEs (FIGURA 15 A e B).

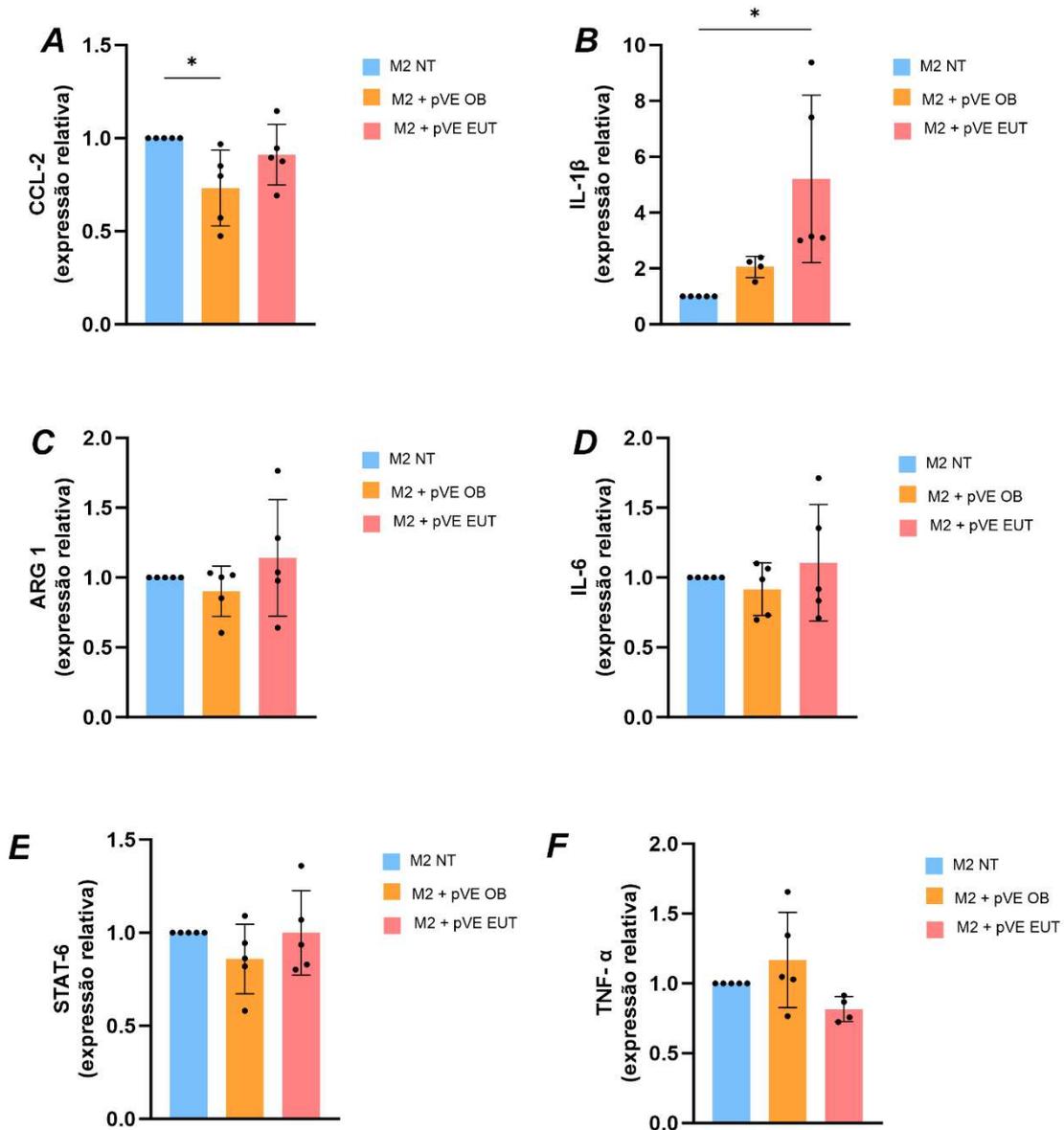


Figura 15. Efeito das VE's do tecido adiposo de indivíduo com obesidade e eutrófico, na expressão genica de Macrófagos M2. Macrófagos perfil M2 foram tratados com pVE's TA indivíduos com obesidade e eutrófico. Após 24h os níveis relativos de transcritos dos genes: (A) CCL-2; (B) IL-1 β ; (C) ARG1; (D) IL-6; (E) STAT-6 e (F) TNF- α , foram analisados. GAPDH foi usado como controle endógeno de todos os genes analisados. M2 NT: células não tratadas; M2 + pVE OB :Macrófagos tratados com 25 μ g/mL VE's TA indivíduo com obesidade; M2 + pVE's

EUT: Macrófagos tratados com 25µg/mLVE's TA indivíduo eutrófico. * P< 0,05 comparando-se aos respectivos grupos.

5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho busca entender o papel das pVEs do TA sobre macrófagos humanos. Utilizando a dinâmica da polarização macrofágica, observamos que esta é influenciada pelo microambiente e pode resultar em fenótipos mistos com coexistência de perfis M1 e M2. A literatura sugere que, além das citocinas, as pVE's desempenham papéis críticos na modulação da homeostase metabólica e inflamatória. Estudos demonstraram que macrófagos residentes no tecido adiposo de camundongos magros contribuem para a homeostase dos tecidos ao serem polarizados em direção ao fenótipo M2. No entanto, a obesidade leva a um aumento do número de macrófagos do tipo M1 residentes no TA, pró-inflamatórios, resultando em distúrbios metabólicos associados à obesidade (PAN ET AL., 2019).

Nossa pesquisa encontrou resultados que corroboram a literatura e a hipótese de que pVE's de TA de indivíduos com obesidade (pVE's TA OB) e com eutrofia (pVE's TA EUT) são capazes de alterar a plasticidade e fenótipo dos macrófagos. Avaliando a secreção de citocinas, macrófagos não-polarizados (MØ), quando estimulados com pVE's de TA OB, foram capazes de promover significativamente o aumento das interleucinas IL-1β e IL-6 em comparação com o controle negativo (NT). A IL-1β é uma importante citocina pró-inflamatória que atua principalmente através da indução de uma rede de citocinas, quimiocinas e mediadores de pequenas moléculas, induzindo a produção de IL-6 e em conjunto promovem o aumento de IL-8. A expressão de IL-8 é influenciada por diversos estímulos, principalmente que desencadeiam estresse celular, como, por exemplo, produção de ROS, privação de nutrientes, hipóxia e secreção de fatores pró-inflamatórios como por TNF-α, IL-1β ou infiltração de macrófagos (COSTA ET AL., 2013; PAN ET AL., 2019).

A expressão do TNF-α está aumentada no TA de indivíduos com obesidade, sendo capaz de promover diversas desordens no metabolismo, como a diminuição da absorção e armazenamento de ácidos graxos, aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias no TA e sangue periférico, como

leptina e resistina, respectivamente, e diminuição da produção de adiponectina (MACHADO ET AL., 2022). Entre as citocinas imunomoduladoras desreguladas na obesidade, a IL-6 é uma das citocinas mais frequentemente implicadas, uma vez que os seus níveis circulantes elevados são consistentemente observados em modelos de camundongos com obesidade e em humanos. Na inflamação aguda, a IL-6 também é responsável pela ativação de células T, infiltração tecidual e manutenção da memória (XU ET AL., 2017), e pode ter um papel causal na produção de resistência à insulina, principalmente através da indução do regulador inibitório, proteína supressora de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) no fígado. Entretanto, outros estudos demonstraram que camundongos deficientes em IL-6 são suscetíveis à resistência à insulina e ao diabetes tipo 2 (MAUER ET AL., 2014).

O estudo de MAUER ET AL., 2014 investigou diretamente a sinalização da IL-6 nos macrófagos, uma vez que essas células são mediadores centrais da inflamação associada à obesidade, e descobriu que a IL-6 preparou os macrófagos para a polarização M2 dependente de IL-4, induzindo a expressão do receptor para IL-4 (IL-4R). Em camundongos com inativação condicional do gene que codifica a cadeia IL-6R α do receptor para IL-6 (IL-6RA) em células mieloides, observaram maior propensão ao desenvolvimento de inflamação induzida pela obesidade e intolerância à glicose, bem como resposta exagerada à endotoxemia induzida por LPS. Indicando IL-6 como reguladora da ativação alternativa de macrófagos durante condições inflamatórias como obesidade (MAUER ET AL., 2014).

Dados encontrados pelo mesmo estudo vão de encontro com os resultados encontrados na nossa pesquisa, onde macrófagos polarizados para um fenótipo M2 aos serem tratados com pVE's TA EUT foram capazes de promover significativamente o aumento da interleucina IL-6 em comparação com o controle, Não tratado (NT) e com Macrófagos M2 tratados com pVE's TA de indivíduos com obesidade. Quando analisadas isoladamente sem serem cultivadas em cultura com células, as pVE's TA OB demonstraram tendências nos três fenótipos M \emptyset , M1e M2, quando comparadas com seu grupo controle (macrófagos pVE's de TA), mas as seguintes citocinas obtiveram diferença significativas: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 e MCP-1.

Um resultado notável da pesquisa vai ao encontro da literatura, que afirma que pequenas vesículas extracelulares derivadas de células são capazes de transferir informações como miRNAs, mRNAs e proteínas não apenas de maneira parácrina (entre células da mesma origem) como também de maneira endócrina (para células-alvo distantes) (X. YU ET AL., 2016), nos dados encontrados podemos observar que citocinas são acondicionadas e secretadas via pVEs .O fato de que grande parte das citocinas são secretadas diretamente pela célula, sugere que estas citocinas acondicionadas pelas pVEs sejam destinadas à sinalização em locais distantes (LOPEZ-CASTEJON & BROUGH, 2011). É desconhecido como se dá esse processo de empacotamento e secreção e se a obesidade afeta a interação ligante-receptor específica pelas células receptoras, e como ela medeia a captação e a adesão das pVEs derivadas de adipócitos.(KWAN ET AL., 2021)

Macrófagos de fenótipo M2 participam da remodelação tecidual, regulação do ambiente tumoral, reações de hipersensibilidade e regulação da imunidade. Produzem citocinas complexas e possuem várias funções, podendo ser divididos em subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d, com base no subconjunto ativado alternativamente, células supressoras derivadas de mieloides, macrófagos pró-fibróticos (M2a) e TAMs. Atualmente, é muito abordado na literatura o papel dos miRNAs na polarização dos macrófagos e as pVEs estão sendo destacadas como importantes transportadores de sinalização de miRNA. Estudos demonstram que as pVEs derivados de adipócitos de pacientes obesos carregam níveis elevados de miRNAs específicos, como: miR-223 que induz a polarização do macrófago M2 por meio da alteração da glicólise, e miR-34a que em contraste suprime a polarização do macrófago M2 ao reprimir o fator 4 semelhante a Krüppel (KLF4) que leva à inflamação adiposa induzida pela obesidade. Por outro lado, o miR-124-3p pVE's derivado de células-tronco mesenquimais (MSC) pode promover a polarização de macrófagos M2. E há a possibilidade de as pVE's derivadas de macrófagos exercerem seus efeitos biológicos através de miRNAs .(KWAN ET AL., 2021; C. WANG ET AL., 2021)

Estes dados reforçam os efeitos dos miRNAs das pVEs na polarização dos macrófagos e nos leva a refletir que a presença destes em pVEs tanto em indivíduos eutróficos com em obesos, devem se diferenciar em questão de

quantidade ou a forma como é expressa. Essa hipótese justificaria o dado encontrado no nosso estudo em que as pVEs de TA de indivíduos eutróficos não reforçaram um perfil anti-inflamatório em macrófagos de fenótipo M2, visto que já é bem descrito na literatura de que em indivíduos eutróficos se predomina TAMs de fenótipo M2, devido à baixa predominância de mediadores inflamatórios no TA.

Reforçando a ideia de que a condição do TA, sendo de um indivíduo eutrófico ou obeso, reflete em diferentes impactos das pVEs de TA nas células receptoras, estudos demonstraram que, em condições obesas, os níveis de proteína da proteína quimioatraente de monócitos CCL-2, interleucina-6 e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) são maiores quando comparados ao TA de indivíduos eutróficos. A quimiocina CCL2, é um importante fator solúvel na condução da infiltração monocítica de tecidos durante processos inflamatórios, frequentemente considerada característica da resposta Th2/M2. (CARSON ET AL., 2017; R. LI ET AL., 2022)

A literatura demonstra que o bloqueio de CCL2 diminui a produção de citocinas Th2 em modelos animais de infecção, e a produção de CCL2 frequentemente promove a produção de citocinas do tipo Th2 como IL-4 (CARSON ET AL., 2017). A CCL2 também foi implicada em casos de ativação crônica do tipo M1, como observado em macrófagos do tecido adiposo de pacientes com diabetes tipo 2 (MEIJER ET AL., 2011). Não tendo uma condução de respostas imunes específicas de citocinas e na polarização de macrófagos, observamos que o macrófago com fenótipo M2 ao ser tratado com pVE's TA indivíduo com obesidade diminui significativamente a expressão de CCL-2 podendo induzi-lo para um perfil M1 ou M2a. Quando avaliando a expressão de IL-1 β , percebemos que pVE's TA indivíduo com eutrofia induz o macrófago com fenótipo M2 a um possível perfil M2b.

Embora estudos como o do autor Kwan et al., 2021 afirmem que os conteúdos das pVEs derivadas de TA são diferentes em indivíduos obesos e eutróficos, nosso estudo acrescenta a necessidade de investigar a composição dessas vesículas pois acreditamos que a diferença da resposta da célula receptora também está relacionada a quantidade de diferentes moléculas. Visto

que o mecanismo responsável pela liberação de conteúdo dessas pVEs para o citosol das células receptoras para sinalização ainda não foi bem elucidado.

Entender como ocorre a entrega da carga das pVEs ao citosol da célula receptora após serem ou não internalizados por meio de fagocitose, endocitose ou fusão de membrana se torna necessário para compreender como se dá essa interação entre ligantes e receptores celulares que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular. Uma vez que é desconhecido como a obesidade afeta a internalização das pVEs nas células receptoras ou na interação direta proteína-proteína. No ambiente do TA de indivíduos com obesidade, a propriedade biofísica da membrana das células receptoras pode ser alterada, o que pode afetar o processo de captação pelas células receptoras. O que nos leva a refletir se esta e as demais condições provocadas pela patologia são os protagonistas e influenciadores do ambiente tecidual ou se as próprias pVEs que predispõe essas condições e alterações do meio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as pVEs derivadas do TA obeso exercem um papel crucial na modulação imunológica, influenciando tanto a secreção de mediadores inflamatórios quanto a plasticidade e expressão gênica de macrófagos. Observamos que as pVEs do TA obesogênico carregam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, MCP-1 e TGF- β , além de NO, sugerindo seu envolvimento na amplificação da resposta inflamatória sistêmica em indivíduos obesos. Esse perfil inflamatório foi reforçado pelos efeitos distintos das pVEs sobre os diferentes fenótipos de macrófagos, especialmente nos macrófagos M \emptyset e M1, que apresentaram aumento significativo de citocinas inflamatórias após tratamento com pVEs de indivíduos obesos.

Adicionalmente, observamos que as pVEs de TA obeso transformaram significativamente a expressão de genes inflamatórios, como CCL-2, enquanto as pVEs de TA eutrófico modulam a expressão de genes como IL-1 β , sugerindo que a origem das pVEs é determinante na regulação gênica e na modulação fenotípica dos macrófagos.

Esses achados indicam que as pVEs do TA obeso podem desempenhar um papel central na perpetuação da inflamação crônica associada à obesidade e suas complicações, como resistência à insulina. Portanto, a compreensão do papel das pVEs na obesidade, a identificação do seu conteúdo, bem como possíveis mecanismos de ação, se torna essencial para uma visão aprofundada dos resultados da obesidade, possibilitando correlacionar seus efeitos e seu potencial como alvos terapêuticos na intervenção de doenças metabólicas relacionadas à inflamação sistêmica.

7. REFERÊNCIAS

- Aldiss, P., Betts, J., Sale, C., Pope, M., Budge, H., & Symonds, M. E. (2018). Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism*, *81*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.009>
- Asghar, A., & Sheikh, N. (2017). Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cellular Immunology*, *315*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.03.001>
- Barakat, B., & Almeida, M. E. F. (2021). Biochemical and immunological changes in obesity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *708*, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108951>
- Barchetta, I., Cimini, F. A., Ciccarelli, G., Baroni, M. G., & Cavallo, M. G. (2019). Sick fat: the good and the bad of old and new circulating markers of adipose tissue inflammation. *Journal of Endocrinological Investigation*, *42*(11), 1257–1272. <https://doi.org/10.1007/s40618-019-01052-3>
- Blanes, S. (2023, March 3). *Até 2035, um em cada 4 adultos conviverá com a obesidade no mundo*. Associação Brasileira Para o Estudo Da Obesidade e Síndrome Metabólica .
- Carson, W. F., Salter-Green, S. E., Scola, M. M., Joshi, A., Gallagher, K. A., & Kunkel, S. L. (2017). Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. *Cellular Immunology*, *314*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.02.005>
- Corrêa, Heyn, & Magalhaes. (2019). The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, *8*(7), 662. <https://doi.org/10.3390/cells8070662>
- Costa, D. L., Rocha, R. L., Carvalho, R. M. A., Lima-Neto, A. S., Harhay, M. O., Costa, C. H. N., Barral-Neto, M., & Barral, A. P. (2013). Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and Global Health*, *107*(2), 78–87. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000078>
- Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Ghossein, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P. D., Théry, C., Witwer, K. W., & Carter, D. R. F. (2021). A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(14). <https://doi.org/10.1002/jev2.12144>
- Crewe, C. (2022). The challenges of interrogating adipose tissue extracellular vesicle functions in physiology. *Communications Biology*, *5*(1), 581. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03511-9>

- Diez-Echave, P., Vezza, T., Rodríguez-Nogales, A., Ruiz-Malagón, A. J., Hidalgo-García, L., Garrido-Mesa, J., Molina-Tijeras, J. A., Romero, M., Robles-Vera, I., Pimentel-Moral, S., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., García, F., Duarte, J., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Gálvez, J. (2020). The prebiotic properties of Hibiscus sabdariffa extract contribute to the beneficial effects in diet-induced obesity in mice. *Food Research International*, *127*, 108722. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108722>
- Engin, A. B. (2017). *Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity* (pp. 327–343). https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_14
- Fischer, A. W., Albers, K., Schlein, C., Sass, F., Krott, L. M., Schmale, H., Gordts, P. L. S. M., Scheja, L., & Heeren, J. (2019). PID1 regulates insulin-dependent glucose uptake by controlling intracellular sorting of GLUT4-storage vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1865*(6), 1592–1603. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.010>
- Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., & Kalergis, A. M. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*, *154*(2), 186–195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>
- Guerreiro, V. A., Carvalho, D., & Freitas, P. (2022). Obesity, Adipose Tissue, and Inflammation Answered in Questions. *Journal of Obesity*, *2022*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/2252516>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K. Q., Kuzma, J. N., Larson, I., Billing, P. S., Landerholm, R. W., Crouthamel, M., Gozal, D., Hwang, S., Singh, P. K., & Becker, L. (2014). Metabolic Dysfunction Drives a Mechanistically Distinct Proinflammatory Phenotype in Adipose Tissue Macrophages. *Cell Metabolism*, *20*(4), 614–625. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.010>
- Kwan, H. Y., Chen, M., Xu, K., & Chen, B. (2021). The impact of obesity on adipocyte-derived extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(23), 7275–7288. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03973-w>
- Li, R., Li, D., Wang, H., Chen, K., Wang, S., Xu, J., & Ji, P. (2022). Exosomes from adipose-derived stem cells regulate M1/M2 macrophage phenotypic polarization to promote bone healing via miR-451a/MIF. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02823-1>

- Li, X., Ren, Y., Chang, K., Wu, W., Griffiths, H. R., Lu, S., & Gao, D. (2023). Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. *Frontiers in Immunology*, *14*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1153915>
- Li, Y., Yin, Z., Fan, J., Zhang, S., & Yang, W. (2019). The roles of exosomal miRNAs and lncRNAs in lung diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0080-7>
- Lian, Q., Zhang, K., Zhang, Z., Duan, F., Guo, L., Luo, W., Mok, B. W.-Y., Thakur, A., Ke, X., Motalebnejad, P., Nicolaescu, V., Chen, J., Ma, C. Y., Zhou, X., Han, S., Han, T., Zhang, W., Tan, A. Y., Zhang, T., ... Chen, H. J. (2022). Differential effects of macrophage subtypes on SARS-CoV-2 infection in a human pluripotent stem cell-derived model. *Nature Communications*, *13*(1), 2028. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29731-5>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, *12*.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *22*(4), 189–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., da Silva, D. S., Farias, G. R., de Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutrition & Metabolism*, *19*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, *12*(1), 4389. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>
- Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M. C., Ruud, J., Nguyen, K. D., Theurich, S., Hausen, A. C., Schmitz, J., Brönneke, H. S., Estevez, E., Allen, T. L., Mesaros, A., Partridge, L., Febbraio, M. A., Chawla, A., Wunderlich, F. T., & Brüning, J. C. (2014). Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature Immunology*, *15*(5), 423–430.
<https://doi.org/10.1038/ni.2865>
- Meijer, K., de Vries, M., Al-Lahham, S., Bruinenberg, M., Weening, D., Dijkstra, M., Kloosterhuis, N., van der Leij, R. J., van der Want, H., Kroesen, B.-J.,

- Vonk, R., & Rezaee, F. (2011). Human Primary Adipocytes Exhibit Immune Cell Function: Adipocytes Prime Inflammation Independent of Macrophages. *PLoS ONE*, *6*(3), e17154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017154>
- Mushenkova, N. V., Nikiforov, N. G., Shakhpazyan, N. K., Orekhova, V. A., Sadykhov, N. K., & Orekhov, A. N. (2022). Phenotype Diversity of Macrophages in Osteoarthritis: Implications for Development of Macrophage Modulating Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), 8381. <https://doi.org/10.3390/ijms23158381>
- Nimptsch, K., Konigorski, S., & Pischon, T. (2019). Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism*, *92*, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.006>
- O'Rourke, R. W. (2018). Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, *14*(11), 1755–1763. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2018.07.032>
- Pan, Y., Hui, X., Hoo, R. L. C., Ye, D., Chan, C. Y. C., Feng, T., Wang, Y., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2019). Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(2), 834–849. <https://doi.org/10.1172/JCI123069>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2017). Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(7), 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.004>
- Piché, M.-E., Tchernof, A., & Després, J.-P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, *126*(11), 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J.-P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., & St-Onge, M.-P. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, *143*(21). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>
- Priscilla, L., Yoo, C., Jang, S., Park, S., Lim, G., Kim, T., & Lee, D. Y. (2024). Immunotherapy targeting the obese white adipose tissue microenvironment: Focus on non-communicable diseases. *Bioactive Materials*, *35*, 461–476. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.01.027>
- Ratajczak, M. Z., & Ratajczak, J. (2020). Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia*, *34*(12), 3126–3135. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>

- Rutkowski, J. M., Stern, J. H., & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *Journal of Cell Biology*, 208(5), 501–512. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409063>
- Schweitzer, G. R. B., Rios, I. N. M. S., Gonçalves, V. S. S., Magalhães, K. G., & Pizato, N. (2021). Effect of *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake on the eicosanoid profile in individuals with obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Journal of Nutritional Science*, 10, e53. <https://doi.org/10.1017/jns.2021.46>
- Sorisky, A., Molgat, A. S. D., & Gagnon, A. (2013). Macrophage-Induced Adipose Tissue Dysfunction and the Preadipocyte: Should I Stay (and Differentiate) or Should I Go? *Advances in Nutrition*, 4(1), 67–75. <https://doi.org/10.3945/an.112.003020>
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., Lee, M.-Y., Takahashi, H., So, K., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Hellbach, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y.-H., & Goodyear, L. J. (2015). A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis. *Diabetes*, 64(6), 2002–2014. <https://doi.org/10.2337/db14-0704>
- Sung, B. H., von Lersner, A., Guerrero, J., Krystofiak, E. S., Inman, D., Pelletier, R., Zijlstra, A., Ponik, S. M., & Weaver, A. M. (2020). A live cell reporter of exosome secretion and uptake reveals pathfinding behavior of migrating cells. *Nature Communications*, 11(1), 2092. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15747-2>
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>
- Tsai, Y.-W., Fu, S.-H., Dong, J.-L., Chien, M.-W., Liu, Y.-W., Hsu, C.-Y., & Sytwu, H.-K. (2020). Adipokine-Modulated Immunological Homeostasis Shapes the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9564. <https://doi.org/10.3390/ijms21249564>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Wang, C., Ma, C., Gong, L., Guo, Y., Fu, K., Zhang, Y., Zhou, H., & Li, Y. (2021). Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803037>
- Wang, C.-H., Tsuji, T., Wu, L.-H., Yang, C.-Y., Huang, T. L., Sato, M., Shamsi, F., & Tseng, Y.-H. (2024). Endothelin 3/EDNRB signaling induces thermogenic

- differentiation of white adipose tissue. *Nature Communications*, 15(1), 7215. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51579-0>
- Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A., & Sancho, D. (2022). Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(3), 384–408. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Xu, E., Pereira, M. M. A., Karakasilioti, I., Theurich, S., Al-Maarri, M., Rappl, G., Waisman, A., Wunderlich, F. T., & Brüning, J. C. (2017). Temporal and tissue-specific requirements for T-lymphocyte IL-6 signalling in obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Nature Communications*, 8(1), 14803. <https://doi.org/10.1038/ncomms14803>
- Yamada, T., Kimura-Koyanagi, M., Sakaguchi, K., Ogawa, W., & Tamori, Y. (2023). Obesity and risk for its comorbidities diabetes, hypertension, and dyslipidemia in Japanese individuals aged 65 years. *Scientific Reports*, 13(1), 2346. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29276-7>
- Yu, P., Yuan, R., Yang, X., & Qi, Z. (2019). Adipose tissue, aging, and metabolism. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 5, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.02.003>
- Yu, X., Odenthal, M., & Fries, J. (2016). Exosomes as miRNA Carriers: Formation–Function–Future. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2028. <https://doi.org/10.3390/ijms17122028>
- Zhao, A., Jiang, F., Yang, G., Liu, H., & Li, L. (2019). Sfrp5 interacts with Slurp1 to regulate the accumulation of triglycerides in hepatocyte steatosis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 512(2), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.035>
- Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., & Plikus, M. V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 27(1), 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>