

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUIZA ROCHA VIEIRA

Papel de Vesículas Extracelulares de adipócitos na ativação de macrófagos durante a infecção *in vitro* por *Mycobacterium bovis* BCG: Análise do metabolismo lipídico e resposta inflamatória

JUIZ DE FORA  
2024

LUIZA ROCHA VIEIRA

Papel de Vesículas Extracelulares de adipócitos na ativação de macrófagos durante a infecção *in vitro* por *Mycobacterium bovis* BCG: Análise do metabolismo lipídico e resposta inflamatória

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Professora Patrícia Elaine de Almeida

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)

Rocha Vieira , Luíza.

Papel de Vesículas Extracelulares de adipócitos na ativação de macrófagos durante a infecção in vitro por Mycobacterium bovis BCG: Análise do metabolismo lipídico e resposta inflamatória / Luíza Rocha Vieira . -- 2024.

62 p. : il.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2024.

1. Vesículas Extracelulares . 2. Microvesículas. 3. Exossomos . 4. Mycobacterium bovis . 5. Corpúsculos lipídicos. I. de Almeida , Patrícia Elaine , orient. II. Título.

**Luiza Rocha Vieira**

**Título:** Papel de Vesículas Extracelulares de adipócitos na ativação de macrófagos durante a infecção *in vitro* por *Mycobacterium bovis* BCG: Análise do metabolismo lipídico e resposta inflamatória

Trabalho Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 07 de outubro de 2024

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dra. Patricia Elaine de Almeida  
Titulação Nome e Sobrenome - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe  
Titulação Nome e Sobrenome  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente



RENATA VIEIRA DE SOUSA SILVA  
Data: 21/10/2024 16:05:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Msc. Renata Vieira de Sousa Silva  
Titulação Nome e Sobrenome  
Universidade Federal do Piauí, UFPI

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos Otávio e Marilza, a quem agradeço por todo o apoio e ensinamentos, sem vocês nada disso seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Marilza e Carlos Otávio por toda contribuição, ajuda financeira durante este período e principalmente por sempre apoiarem todas minhas escolhas e sonhos, obrigada por compreender os momentos de ausência e por sempre se fazerem presentes mesmo distantes, espero poder retribuir vocês da melhor forma possível.

A minha orientadora, Patrícia, por todo o ensino, amizade e parceria durante esses anos. Sua paciência e dedicação em me auxiliar foram imprescindíveis para a conclusão desta etapa. Obrigada por acreditar e confiar em mim, sempre me incentivando a buscar novas oportunidades e tornando meu sonho ainda mais possível.

Aos meus amigos da vida e do ensino médio que se tornaram uma grande família para mim aqui em Juiz de Fora, principalmente Gabriel, Isabela, Laura, Letícia, Luiza D e Mariana só vocês entendem e sabem o que eu passei pra chegar aqui, sem o acolhimento de vocês eu não teria ido tão longe.

Às minhas amigas, Bruna, Ana Luiza e Carolina, Luízas e Lara, vocês deixaram a faculdade mais leve, obrigada por todo companheirismo durante esses anos, os melhores momentos da faculdade foi ao lado de vocês.

Aos demais, professores e parceiros de laboratório que se tornaram grandes amigos durante o processo, obrigada pela troca de conhecimentos e por toda disponibilidade em ajudar quando necessário.

## RESUMO

**Introdução:** A obesidade é caracterizada por um estado inflamatório crônico de baixa intensidade, conhecido como metainflamação. Fatores secretados por adipócitos, incluindo Vesículas Extracelulares (VEs), têm sido propostos como moduladores da função e perfil de macrófagos, intensificando os processos de inflamação metabólica. Além disso, fatores de transcrição como o PPAR $\gamma$  desempenham um papel significativo na regulação da função dos macrófagos e estão envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) durante a infecção por BCG. Os CLs são organelas dinâmicas com funções no armazenamento de lipídios, síntese de mediadores inflamatórios, sinalização celular e funcionam como um nicho de sobrevivência para patógenos intracelulares. No entanto, pouco se sabe sobre o papel das VEs, derivadas de adipócitos, na regulação de vias de sinalização do metabolismo lipídicos e na progressão de infecção por patógenos intracelulares. **Objetivos:** Analisar as interações entre VEs secretadas por adipócitos na ativação de macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, *in vitro*. **Métodos:** Os CLs foram quantificados usando microscopia de fluorescência, e os níveis de citocinas foram medidos por ELISA. As VEs foram isoladas utilizando uma série de etapas de centrifugação, caracterizadas e quantificadas por citometria de fluxo, análise de Zeta Sizer e Micro BCA. **Resultados:** Subpopulações específicas de VEs, nomeadamente microvesículas e exossomos, influenciaram positivamente a formação de CLs e a ativação de macrófagos durante a infecção por BCG. Elas induziram a síntese de TNF- $\alpha$ , e especificamente as microvesículas, foram capazes de induzir a síntese de KC, que foi negativamente modulada nos grupos infectados. Entretanto, esse efeito não foi observado para macrófagos estimulados com exossomos. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que as VEs secretadas por adipócitos desempenham um papel crucial em macrófagos infectados com BCG, promovendo a formação de CLs e a síntese de citocinas. No entanto, mais estudos são necessários para compreender completamente as interações complexas entre adipócitos e macrófagos durante infecções causadas por patógenos intracelulares como o BCG.

**Palavras-chave:** Vesículas extracelulares, microvesículas, exossomos, corpúsculos lipídicos, *Mycobacterium bovis*, adipócitos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is characterized by a chronic low-grade inflammatory state, known as meta-inflammation. Factors secreted by adipocytes, including extracellular vesicles (EVs), have been proposed as modulators of macrophage function and profile, enhancing metabolic inflammation processes. In addition, transcription factors such as PPAR $\gamma$  play a significant role in regulating macrophage function and are involved in the biogenesis of lipid droplets (LDs) during BCG infection. LDs are dynamic organelles involved in lipid storage, synthesis of inflammatory mediators, cellular signaling, and act as a survival niche for intracellular pathogens. However, little is known about the role of adipocyte-derived EVs in regulating lipid metabolism signaling pathways and the progression of infections by intracellular pathogens. **Objectives:** To analyze the interactions between adipocyte-derived EVs and macrophage activation during *Mycobacterium bovis* BCG infection, *in vitro*. **Methods:** LDs were quantified using fluorescence microscopy, and cytokine levels were measured by ELISA. EVs were isolated using a series of centrifugation steps, characterized, and quantified by flow cytometry, Zeta Size analysis, and Micro BCA. **Results:** Specific subpopulations of EVs, namely microvesicles and exosomes, positively influenced LD formation and macrophage activation during BCG infection. They induced TNF- $\alpha$  synthesis, and specifically, microvesicles were able to induce KC synthesis, which was negatively modulated in the infected groups. However, this effect was not observed in macrophages stimulated with exosomes. **Conclusion:** Our findings suggest that adipocyte-derived EVs play a crucial role in macrophages infected with BCG, promoting LD formation and cytokine synthesis. However, further studies are needed to fully understand the complex interactions between adipocytes and macrophages during infections caused by intracellular pathogens such as BCG.

**Keywords:** Extracellular vesicles, microvesicles, exosomes, lipid droplets, *Mycobacterium bovis*, adipocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1—Mapa mundial da estimativa da prevalência da obesidade em adultos em 2024.....	17
Figura 2—Gráfico do crescimento da obesidade no Brasil.....	18
Figura 3—A expansão do tecido adiposo branco na doença de obesidade.....	19
Figura 4—Ativação do PPAR $\gamma$ .....	22
Figura 5—Macrófago infectado exibindo corpúsculos lipídicos (CLs).....	24
Figura 6—Ativação de macrófagos por micobactérias patogênicas.....	27
Figura 7—Representação do tamanho e heterogeneidade das vesículas extracelulares (VEs).....	29
Figura 8— Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1. ....	33
Figura 9— Protocolo de isolamento de microvesículas e exossomos.....	35
Figura 10—Análise do processo de diferenciação celular.....	39
Figura 11—Produção de citocinas por adipócitos infectados.....	40
Figura 12—Análise por Citometria de fluxo de VEs.....	41
Figura 13—Identificação de subpopulações de VEs, exossomos (A) e microvesículas (B), por número.....	42
Figura 14—Quantificação e depletação de MVs e Exossomos do meio controle RPMI 2% SFB.....	43
Figura 15—Biogênese de CLs frente ao estímulo com 100 $\mu$ g Microvesículas (MV) e Exossomos (EXO) .....	45;46
Figura 16— Quantificação de corpúsculos lipídicos após tratamento com microvesículas e exossomos (25 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g) .....	46
Figura 17—Síntese das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com microvesículas e exossomos em três concentrações distintas.....	47
Figura 18—Síntese de citocinas de KC por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com 100 $\mu$ g microvesículas e exossomos e infecção por BCG.....	48
Figura 19: Modulação de macrófagos infectados com M. bovis BCG por MVs e Exossomos.....	55

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR NANODROP .....	44
TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO PROTEICA POR MICRO BCA.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

μ: micro

ADRP: proteína relacionada à diferenciação de adipócitos

AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico AMPc

AP-1: Ativador da proteína 1

AP2: Ativador da proteína 2

ATM's: Macrófagos do tecido adiposo

BCG: Bacilo Calmette-Guérin

CD: Cluster of differentiation

CLs: Corpúsculos lipídicos

COX: Ciclooxygenase

cPLA2α: fosfolipase citosólica A2α

CRP: Proteína c reativa

DEX: Dexametasona

DGAT, acil-CoA: diacilglicerol aciltransferase

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EVs: Vesículas extracelulares

EXO: Exossomos

FAP: fator ativador de plaquetas

FBS: Soro fetal bovino

G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos

GDF-11: Fator de crescimento e desenvolvimento-11

GTPases: Hidrolases que se ligam ao nucleotídeo guanosina trifosfato

HGF: fator de crescimento de hepatócitos

IBMX: Metilisobutilxantina

IFN-γ: Interferon – gama

IGF-1: Fator 1 de crescimento semelhante à insulina

IL: Interleucina

IMC: Índice de massa corporal

iNOS: Enzima NO sintase

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

INS: Insulina (Ins),

IRF: Fator regulatório de interferons  
ISEV: sociedade internacional de vesículas extracelulares  
LDAF1: fator 1 de montagem de gotícula de lipídio  
LDL: Lipoproteína de baixa densidade  
LO: Lipoxigenase  
M1: macrófagos classicamente ativados  
M2: macrófagos alternativamente ativados  
MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos  
MCTP: proteína transmembrana contendo múltiplos domínios C2  
MOI: Multiplicidade de infecções  
MP: membrana plasmática  
MPs: Micropartículas  
MS: Ministério da Saúde  
MSC's: células tronco mesenquimais  
MV'S: microvesículas  
NF-kB: Fator nuclear kappa B  
NLR P3: Receptor NOD like de proteína 3  
NLR: Receptor NOD like  
NO: óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintase  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
ORO: Oil Red O  
PAMP: Padrão molecular associado à patógeno  
PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos  
PAT: Família composta por perilipina, ADRP e TIP47  
PGC-1 $\alpha$ : coativador-1 $\alpha$  do receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma  
PGE 2: Prostaglandinas 2  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase  
PKA: proteína cinase A  
PLA2: Fosfolipase A2  
PLIN: Perilipinas  
PPAR $\gamma$ : Receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomos  
PPRE: elemento de resposta ao proliferador de peroxissomo

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

RE: Retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: Receptor X retinóico

TAB: Tecido Adiposo Branco

TAGs: Triacilgliceróis

TB: Tuberculose

TGF $\beta$ : Fator de crescimento tumoral

TIP47 Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons

TLR: Receptor Toll-like

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

UFC: Unidade formadora de colônia

VE: vesícula extracelular

VEs: Vesículas extracelulares

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b>	16
2.1 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE	16
2.2 PAPEL DO PPAR $\gamma$ NA REGULAÇÃO METABÓLICA	21
2.3 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS (CLS): MODULAÇÃO DA HOMEOSTASE METABÓLICA	23
2.4 MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO DURANTE INFECÇÕES POR PATÓGENOS INTRACELULARES	26
2.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES	28
<b>2.5.1</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>GERAIS</b>	<b>28</b>
<b>2.5.2</b>	<b>PAPEL DAS MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ADIPÓCITOS E MACRÓFAGOS E EM INFECÇÕES INTRACELULARES</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>4 OBJETIVO</b>	32
4.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	32
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
5.1 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1	33
5.2 ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS	34
5.3 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS	35
5.4 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	36
5.5 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER	36
5.6 ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ADIPÓCITOS	36
5.7 INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	37
5.8 COLORAÇÃO COM OIL RED O E BODIPY – ANÁLISE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS	37
5.9 ESTÍMULO COM GW9662 – ANTAGONISTA DE PPAR $\gamma$	38
5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
<b>6 RESULTADOS</b>	39
6.1 DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS NIH3T3-L1	39
6.2 PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ E IL-10 EM ADIPÓCITOS INFECTADOS	40
6.3 ANÁLISE DE SUBPOPULAÇÕES DE VES.	41
<b>6.3.1</b>	<b>CITOMETRIA DE FLUXO</b>
<b>6.3.2</b>	<b>ANÁLISE DO TAMANHO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS</b>
<b>6.3.3</b>	<b>PESQUISA DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NO MEIO RPMI CONTENDO 2% DE SORO FETAL BOVINO (FBS)</b>
<b>6.3.4</b>	<b>ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO DAS AMOSTRAS DOS ADIPÓCITOS</b>
6.4 BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS	44

INFECTADOS OU NÃO COM <i>Mycobacterium bovis</i> BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MVS OU EXOS.....	45
6.5 SÍNTESE DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS.....	46
6.6 SÍNTESE DE KC POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS COM MICROVESÍCULAS OU EXOSSOMOS .....	47
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
.....	

## 9 REFERÊNCIAS 56

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que tem assumido proporções epidêmicas em todo o mundo, afetando milhões de pessoas e contribuindo significativamente para o aumento das taxas de mortalidade e morbidade relacionadas a doenças metabólicas (Ouchi et al., 2021; Choe et al., 2016). Originalmente associada a países de alta renda, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública global, impactando nações de baixa e média renda (Jayabalan et al., 2017; Camino et al., 2020). Definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e caracterizada por um índice de massa corporal (IMC) superior a 30, a obesidade está intimamente relacionada a uma série de complicações, incluindo diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares (Hill, 2019; Gao et al., 2017). Contudo, nos últimos anos, o entendimento da obesidade evoluiu, com o reconhecimento de sua natureza inflamatória subjacente, o que ampliou as perspectivas sobre seu impacto na saúde e na função imunológica (Mathieu et al., 2019; Ouchi et al., 2021).

A inflamação associada à obesidade é um fenômeno conhecido como metainflamação, caracterizado por uma resposta inflamatória crônica de baixo grau, mediada por células do tecido adiposo e do sistema imunológico (Théry et al., 2018; Record et al., 2018). A hipertrofia do tecido adiposo branco (TAB), um dos principais reservatórios de energia do corpo, resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) (Camino et al., 2020; Ouchi et al., 2021). Essa resposta inflamatória persistente não apenas contribui para a resistência à insulina, mas também está associada à progressão de outras complicações metabólicas e à disfunção imunológica (Engin, 2017; Rajaram et al., 2010).

Nesse contexto, os corpúsculos lipídicos (CLs), organelas envolvidas no armazenamento de lipídios e na regulação metabólica, desempenham um papel central. Inicialmente considerados simples depósitos de energia, os CLs agora são reconhecidos por sua participação ativa em processos inflamatórios e na defesa do hospedeiro, especialmente durante infecções (Bozza et al., 2021; Almeida et al., 2020). A formação de corpúsculos lipídicos em células como macrófagos e adipócitos é desencadeada por estímulos metabólicos e inflamatórios, e sua presença tem sido amplamente documentada em diversas condições patológicas, como a obesidade e

infecções micobacterianas (Almeida et al., 2014; DÁvila et al., 2019). Macrófagos espumosos, ricos em corpúsculos lipídicos, estão frequentemente presentes em granulomas formados durante a Tuberculose, demonstrando que essas estruturas celulares desempenham um papel crucial na resposta imunológica e na sobrevivência dos patógenos intracelulares, como o *Mycobacterium tuberculosis* (Rajaram et al., 2010; DÁvila et al., 2019).

Paralelamente, as vesículas extracelulares (VEs) emergiram como importantes mediadoras da comunicação intercelular, desempenhando papéis significativos na inflamação e na regulação do metabolismo (Théry et al., 2018; Pegtel & Gould, 2019). Liberadas por diversas células, incluindo macrófagos e adipócitos, as VEs transportam moléculas bioativas, como lipídios, proteínas e RNA, influenciando não apenas a interação entre essas células, mas também a dinâmica dos corpúsculos lipídicos (Almeida et al., 2020; Bozza et al., 2021).

Essa interação sugere uma complexa rede de sinalização que conecta processos inflamatórios, regulação metabólica e a resposta imunológica, formando uma base intrincada para o desenvolvimento de condições crônicas, como obesidade e infecções. A sobreposição dessas vias inflamatórias e metabólicas revela novos insights sobre o papel dos corpúsculos lipídicos e vesículas extracelulares na modulação da imunidade e na progressão de doenças (DÁvila et al., 2019; Ouchi et al., 2021).

## **2 REFERÊNCIAL TEÓRICO**

### **2.1 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE**

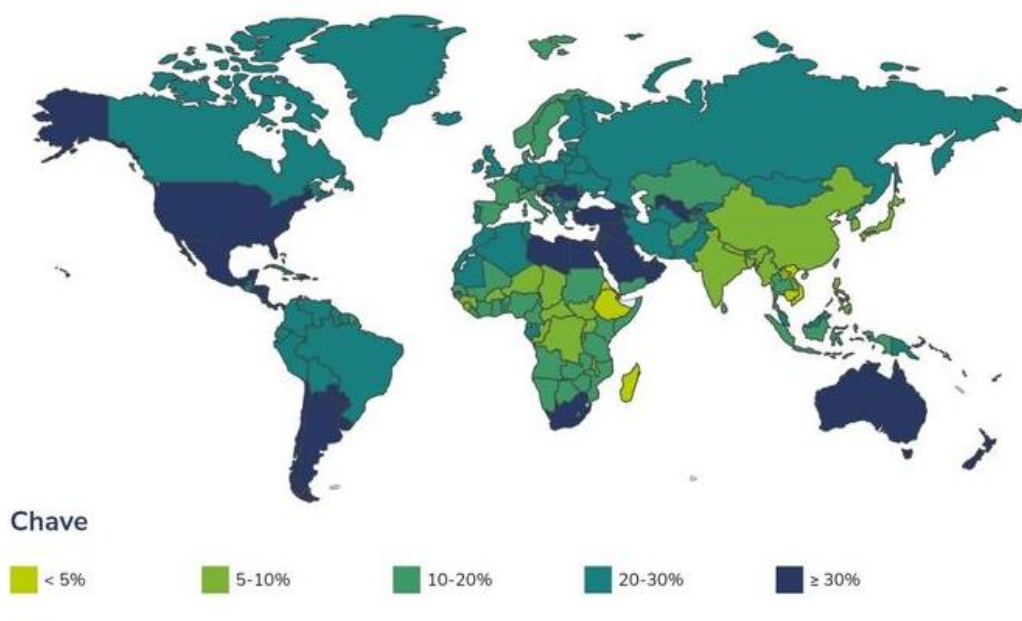
A obesidade tem sido reconhecida como um problema de saúde pública desde a década de 1980 e, atualmente, alcançou proporções epidêmicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 2,8 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao sobrepeso ou à obesidade. Originalmente associada a países de alta renda, a obesidade também se tornou prevalente em nações de renda baixa e média.

Em 2023, um relatório da Federação Mundial de Obesidade (WOF) revelou que 1 em cada 7 pessoas no mundo sofre de obesidade, conforme ilustrado no mapa mundial da estimativa da prevalência da obesidade em adultos as projeções para

2035 indicam que quase 2 bilhões de pessoas viverão com essa condição, caracterizada por um índice de massa corporal (IMC) superior a 30 (Figura 1) (ABESO, 2023).

### Estimativas de prevalência de obesidade em adultos

Obesidade IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Todos os adultos



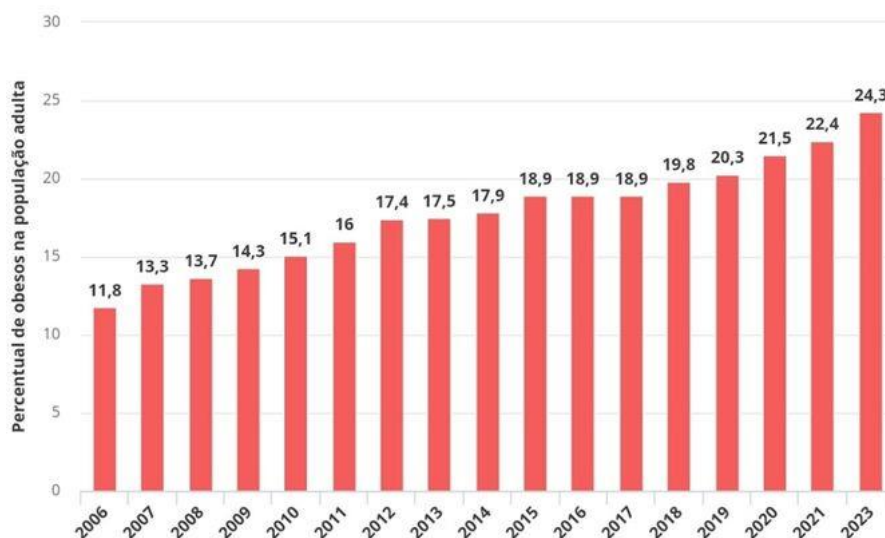
Fonte: NCD RisC: <https://www.ncdrisc.org/data-downloads-adiposity.html>

Figura 1 — Mapa mundial da estimativa da prevalência da obesidade em adultos em 2024. Fonte: <https://data.worldobesity.org/maps/?area=maps>

No Brasil, a prevalência da obesidade aumentou 72% nos últimos treze anos, atingindo 20,3% em 2019. Dados recentes da Vigilância de Fatores de Risco de Doenças Crônicas do Inquérito Telefônico (Vigitel) 2023, monitoramento anual do Ministério da Saúde, mostram que a proporção de adultos com obesidade é de 1 em cada 4, configurando uma situação alarmante, conforme mostrado no gráfico abaixo. A pesquisa revela que 24,3% dos adultos brasileiros são obesos, com a porcentagem mais alta entre homens de 45 a 54 anos, atingindo 32,6%, e a porcentagem mais baixa entre mulheres de 18 a 24 anos, com 11,8% (Figura 2) (Vigitel, 2023).

### 1 a cada 4 adultos é obeso no Brasil

Percentual mais que dobrou em 2023 em relação a 2006



Fonte: Pesquisa Vigilância de Fatores de Risco de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) do Ministério da Saúde

Figura 2- Gráfico do crescimento da obesidade no Brasil. Fonte: <https://oglobo.globo.com/saude/noticia/2024/03/04/dia-mundial-da-obesidade-1-a-cada-4-adultos-no-brasil-e-obeso-veja-o-ranking-das-capitais.ghtml>

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e é definida pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado dividindo-se o peso da pessoa em quilogramas pelo quadrado de sua altura em metros ( $\text{kg/m}^2$ ). Essa condição resulta de um balanço energético positivo crônico, no qual a ingestão calórica excede o gasto energético.

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da obesidade, incluindo predisposição genética, comportamento alimentar, nível de atividade física, fatores psicológicos e condições socioeconômicas, tornando-a uma condição multifatorial (Pereira, 2023; World Health Organization, 2023). Além disso, aspectos ambientais, como a disponibilidade de alimentos com alta densidade calórica e a urbanização, desempenham um papel significativo no processo (Francischi et al., 2022; Ministério da Saúde, 2023).

Do ponto de vista fisiopatológico, a obesidade está associada a alterações metabólicas significativas. O acúmulo excessivo de gordura corporal leva à hipertrofia do tecido adiposo branco (TAB). Este tecido responde ao excesso de ácidos graxos por meio de dois processos principais: a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos,

fenômeno conhecido como adipogênese (Lessard et al., 2023; Kramer et al., 2022; Francischi et al., 2022).

A adipogênese envolve a diferenciação de precursores em adipócitos maduros e o subsequente aumento tanto no número quanto no tamanho desses adipócitos, contribuindo para o aumento da massa adiposa e a progressão da obesidade. Além disso, a lipogênese e a lipólise são processos metabólicos que alteram o tamanho (diâmetro e volume) dos adipócitos maduros (Figura 3). À medida que o diâmetro dos adipócitos aumenta até seu limite máximo e sua capacidade de armazenamento de gordura diminui, novas células são recrutadas para o tecido adiposo (Lessard et al., 2023; Rydén et al., 2022; Drolet et al., 2021). Quando os adipócitos se tornam excessivamente grandes, eles podem perder a capacidade de estocar gordura e se tornar mais lipolíticos. Isso resulta em uma maior concentração de ácidos graxos livres no plasma, potencialmente levando a danos às funções de órgãos não adiposos, um fenômeno conhecido como lipotoxicidade (Klop et al., 2022; Rydén et al., 2021; Smith et al., 2023).



Figura 3- A expansão do tecido adiposo branco na doença de obesidade. O tecido adiposo branco responde ao excesso de calorias por meio de expansão saudável ou não. A expansão saudável através da hiperplasia adipocitária fornece proteção contra os efeitos metabólicos da obesidade. As complicações metabólicas associadas à obesidade são agravadas pela expansão não saudável através da hipertrofia de adipócitos. O consumo de dietas hipercalóricas resulta em ganho de peso corporal, o que resulta em sobrecarga metabólica e aumento de triglicerídeos e glicose no sangue (Adaptado de Longo et al. 2024).

Pesquisas sobre os mecanismos inflamatórios associados à obesidade têm ganhado destaque, principalmente com a descoberta de que a obesidade pode induzir

um estado inflamatório nos tecidos, incluindo o tecido adiposo (Saltiel & Olefsky, 2023; Hotamisligil, 2022; Lumeng et al., 2021). A inflamação metabólica é caracterizada por uma resposta inflamatória persistente e de baixo grau, mediada por células adiposas e imunológicas em resposta ao excesso de nutrientes, considerado o principal gatilho imunológico na obesidade. Esta inflamação metabólica pode ter vários efeitos metabólicos, contribuindo para a resistência à insulina e problemas relacionados ao metabolismo (Blaszczyk, Jalilvand & Hsueh, 2021).

O tecido adiposo branco (TAB) produz diversas citocinas e adipocinas durante o processo de metainflamação, o qual ativa o sistema imunológico por períodos prolongados e atrai células imunes para o tecido adiposo (Gregor & Hotamisligil, 2011; Engin et al., 2017; Blaszczyk, Jalilvand & Hsueh, 2021). Entre as citocinas produzidas pelo TAB, destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estudos mostraram que a concentração de TNF- $\alpha$  está aumentada em tecidos adiposos e adipócitos de camundongos obesos em comparação com camundongos eutróficos, sendo uma das primeiras descobertas sobre a inflamação associada à obesidade (Ellulu et al., 2017; Kanda & Tateya, 2022).

O TNF- $\alpha$ , além de inibir a síntese lipídica, induz a lipólise em indivíduos obesos e pode ser secretado em conjunto com a IL-6 por macrófagos infiltrados no tecido adiposo hipertrofiado (Kanda & Tateya, 2022; Gao et al., 2020; Wensveen et al., 2015). Este componente é crucial para o desenvolvimento da síndrome metabólica, pois amplifica a ação de citocinas pró-inflamatórias (Hotamisligil, 2017; Kanda & Tateya, 2022; Ellulu et al., 2017; Gao et al., 2020). Consequentemente, o TNF- $\alpha$  pode contribuir para o aumento dos ácidos graxos circulantes, levando ao acúmulo de triglicerídeos e lipídios ectópicos em células beta, células musculares e hepatócitos, o que causa estresse e disfunção nessas células (Kanda & Tateya, 2022; You et al., 2021; Gao et al., 2020; Ellulu et al., 2017).

Em condições de sobrecarga metabólica, o organismo tenta restaurar o equilíbrio ao secretar insulina, armazenar lipídios no tecido adiposo e oxidar ácidos graxos no músculo (Hotamisligil, 2017; Kanda & Tateya, 2022). Contudo, quando essa sobrecarga persiste, fatores como a lipotoxicidade associada ao excesso de ácidos graxos, a ativação de macrófagos e a liberação de quimiocinas e citocinas levam ao recrutamento de células do sistema imunológico para o tecido adiposo. Esse processo desencadeia uma inflamação que atrai ainda mais macrófagos e outras células

imunológicas devido à secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1, produzidas por adipócitos e macrófagos residentes (Gao et al., 2020; Kanda & Tateya, 2022; You et al., 2021). A inflamação exacerbada por IL-1 $\beta$  promove a expressão de diversas citocinas e quimiocinas e estimula o recrutamento adicional de macrófagos para os vasos sanguíneos e no tecido adiposo. Além disso, o aumento da permeabilidade intestinal a endotoxinas bacterianas, conhecidas como lipopolissacarídeos, e alterações na microbiota intestinal podem intensificar a inflamação (Belkaid & Hand, 2014; Patterson et al., 2016).

A ativação de várias vias de sinalização em resposta ao excesso de nutrientes pode levar a uma resposta inflamatória. Embora os mecanismos exatos que atraem e/ou ativam células do sistema imunológico nos tecidos obesos ainda não sejam completamente compreendidos, estudos demonstraram que células isoladas da medula óssea podem migrar para meios de cultura condicionados por explantes de adipócitos de pacientes obesos, em resposta aos fatores solúveis liberados. Esses achados evidenciam a estreita conexão entre os tecidos obesos e a infiltração celular (Ito et al., 2008; Ringseis et al., 2015; Tetsuya et al., 2017).

## 2.2 PAPEL DO PPAR $\gamma$ NA REGULAÇÃO METABÓLICA

O receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) é um receptor nuclear pertencente a uma superfamília de fatores de transcrição. Inicialmente, este receptor é conhecido por regular a diferenciação de adipócitos, a captação e o armazenamento de ácidos graxos, o metabolismo lipídico, a homeostase da glicose, a aterogênese e a sensibilidade à insulina (Ahmadian et al., 2013; Jennewein et al., 2018). Além dessas funções, o PPAR $\gamma$  também desempenha papéis importantes na inflamação, imunorregulação, função neuronal, doenças oculares e cardiovasculares, bem como em infecções (Michalik & Wahli, 2021; Joshi et al., 2020; Kammoun et al., 2022).

O PPAR $\gamma$  foi identificado em adipócitos, monócitos e macrófagos de diversos tecidos, incluindo células espumosas associadas a lesões ateroscleróticas (Ahmadian et al., 2013; Jennewein et al., 2018). O PPAR $\gamma$  desempenha um papel importante na regulação do metabolismo lipídico, na homeostase da glicose, e na modulação da resposta inflamatória. Além disso, este receptor é encontrado em outros tipos de

células e possui três isoformas bem identificadas (Michalik & Wahli, 2021; Joshi et al., 2020).

Quando ativado por ligantes, o PPAR $\gamma$  forma um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR) e se associa a regiões promotoras específicas dos genes-alvo no DNA, funcionando como um fator de transcrição. Durante este processo de ativação, após a heterodimerização com o RXR, complexos proteicos compostos por coativadores ou correpressores são recrutados. Uma vez formado, o se liga ao elemento de resposta localizado no promotor do gene-alvo, resultando na regulação da transcrição gênica (Figura 4) (Michalik & Wahli, 2021; Marion-Letellier et al., 2021).

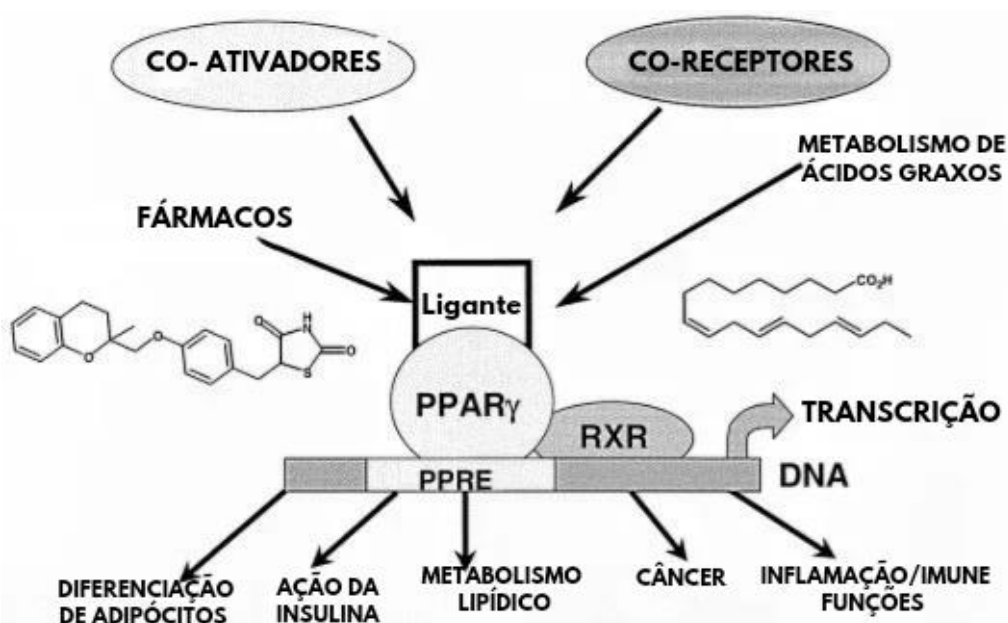


Figura 4- Ativação do PPAR $\gamma$ . O receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) e o receptor retinóide X (RXR) pertencem à superfamília dos receptores nucleares. PPAR $\gamma$  é ativado por numerosos ligantes naturais ou sintéticos. Após a ligação a um ligante, PPAR forma um heterodímero com o receptor retinóide X (RXR) que é ativado por ácido retinóico e recruta coativadores. O complexo então se liga à região promotora do elemento de resposta do proliferador de peroxissomo (PPRE), levando à regulação de genes envolvidos principalmente no metabolismo de lipídios e glicose, inflamação e câncer. Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0739724001001175>

Ademais, o PPAR $\gamma$  desempenha um papel significativo na promoção da expressão de mediadores anti-inflamatórios no sistema imunológico inato e na repressão de genes inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, bem como na inibição da NO sintase induzível (iNOS) (Jiang et al., 2018; Wen et al., 2022). Este efeito ocorre por meio da transrepressão de genes-alvo dos fatores de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), ativador da proteína 1 (AP-1) e transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição (STAT) (Chen et al., 2014;

Jiang et al., 2018). Essas descobertas sugerem que os PPARs não estão envolvidos apenas no metabolismo lipídico, mas também no controle da inflamação.

A função dos PPARs na diferenciação de macrófagos e no acúmulo de lipídios intracelulares tem sido bem documentada (Wen et al., 2022; Jennewein et al., 2018). Ligantes específicos de PPAR $\gamma$  promovem a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) e atuam como agonistas do fator ativador de plaquetas (PAF) e do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), além de estimular a expressão de CD36 na membrana celular. Isso sugere que o PPAR $\gamma$  desempenha um papel crucial na regulação da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (Kammoun et al., 2022; You et al., 2021).

Foi observado que a ativação dos PPARs aumenta a transcrição dos genes que codificam proteínas da família das perilipinas (antigas proteínas PAT), com exceção da proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons (TIP47) (Ahmadian et al., 2013; Jennewein et al., 2018). Essas proteínas, como perilipina e ADRP, ajudam a compartimentalizar ácidos graxos esterificados nos corpúsculos lipídicos para a posterior liberação de ligantes para os PPARs (Wolins et al., 2013; Kammoun et al., 2022). Apesar das várias funções propostas para o PPAR $\gamma$  em macrófagos, o verdadeiro papel deste fator de transcrição na fisiologia e ativação dos macrófagos ainda não é completamente conhecido, e a identidade dos ligantes biológicos para o PPAR $\gamma$  permanece incerta, sendo um tema de intensa investigação.

### 2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS dos CORPÚSCULOS LIPÍDICOS (CLS)

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas altamente dinâmicas e multifuncionais presentes no citoplasma de diversas células. Historicamente, os CLs foram considerados como simples depósitos de lipídios, atuando principalmente no armazenamento de energia sob a forma de triacilgliceróis e ésteres de colesterol (BICKERT, C. et al., 2021). No entanto, descobertas recentes têm revelado que esses corpúsculos desempenham papéis muito mais complexos, participando ativamente de uma série de processos metabólicos e sinalizadores cruciais para a homeostase celular, além de participarem em processos infecciosos, inflamação e câncer (Olzmann & Carvalho, 2019; Thiam & Ikonen, 2021).

Essas organelas são formadas por um núcleo central de lipídios neutros, cercado por uma monocamada de fosfolipídios associada a uma variedade de proteínas, o que os diferencia das organelas convencionais, que possuem uma bicamada lipídica (DÁvila et al., 2013; Bozza et al., 2011; Almeida et al., 2009). Essa monocamada de fosfolipídios confere aos CLs uma arquitetura única que desafia os modelos clássicos de transporte de lipídios e proteínas na célula, já que a ausência de uma segunda camada lipídica implica em mecanismos distintos para a inserção e o trânsito de moléculas (Figura 5) (Walther & Farese, 2009).. Entre as proteínas associadas aos CLs, destacam-se as perilipinas, que são essenciais para a regulação da lipólise, protegendo os lipídios armazenados contra a degradação prematura e controlando o acesso de lipases aos triacilgliceróis (Bozza et al., 2011).

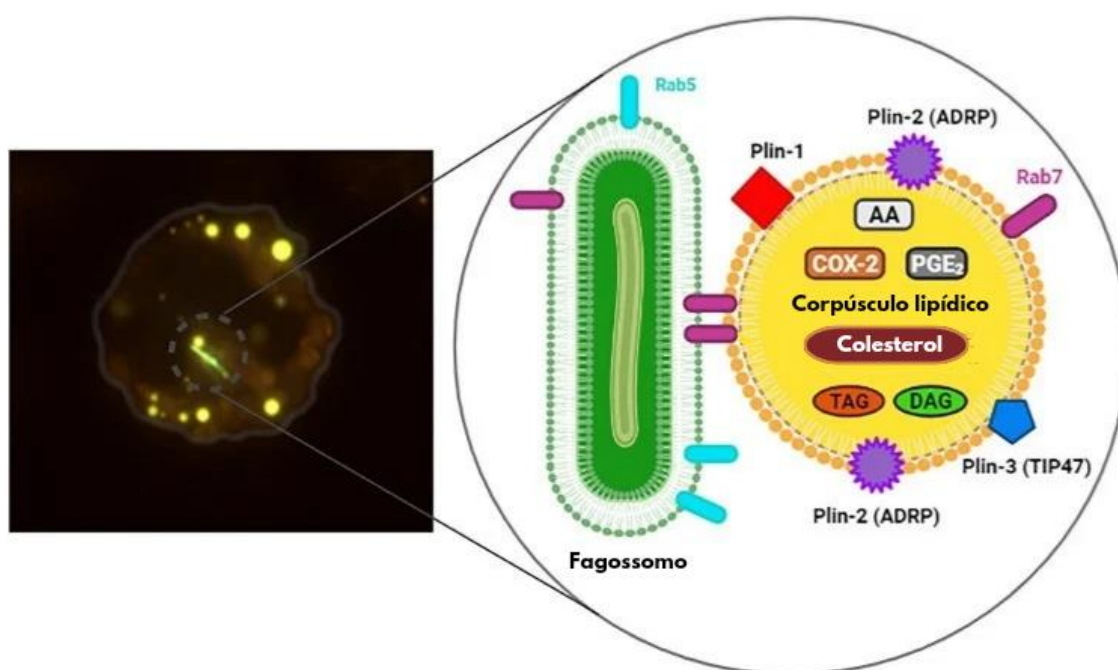


Figura 5- Macrófago infectado exibindo corpúsculos lipídicos (CLs). À esquerda, um macrófago murino exibe micobactérias internalizadas (*M. bovis* BCG) coradas com o Kit de Viabilidade Bacteriana Live/Dead BacLight® (verde), e diversos corpúsculos lipídicos (CLs) citoplasmáticos corados com Bodipy® 493/503 (amarelo). Detalhamento da estrutura e composição de CLs em associação com bactérias dentro de fagossomos (verde), incluindo Rab5 e Rab7. Os componentes destacados incluem triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ciclooxigenase-2 (COX-2), ácido araquidônico (AA), e proteínas estruturais como Plin-1, Plin-2 (ADRP) e Plin-3 (TIP47). (Adaptado et al. 2024) Fonte: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36909724/>

Os CLs não são exclusivos de células animais; eles também estão presentes em organismos tão diversos quanto plantas, fungos e até mesmo procariotos, o que sugere que essas estruturas possuem uma função evolutiva altamente conservada (Almeida et al., 2020; DÁvila et al., 2019; Bozza et al., 2021). A composição lipídica

dos CLs varia conforme o tipo celular e a necessidade metabólica específica. Por exemplo, em adipócitos, que são especializados no armazenamento de energia, os triacilgliceróis são os componentes principais dos CLs. Já em macrófagos espumosos, frequentemente encontrados em lesões ateroscleróticas, os ésteres de colesterol predominam, refletindo a adaptação dessas células ao seu ambiente patológico (Bozza et al., 2021; Almeida et al., 2020).

Morfológicamente, os CLs podem apresentar grande variabilidade. Em células em estado de repouso, os CLs frequentemente aparecem como estruturas eletrondensas quando visualizados ao microscópio eletrônico. Sob estímulos específicos, como inflamação ou estresse celular, os CLs podem alterar sua densidade eletrônica, tornando-se mais elétron-lúcidos, o que pode indicar mudanças na composição lipídica ou na atividade metabólica (DUARTE, F. O. et al., 2011). Técnicas de coloração específicas, como Oil Red O e Bodipy, são amplamente utilizadas para identificar e quantificar os lipídios presentes nos CLs, fornecendo informações valiosas sobre o estado metabólico das células (Bozza et al., 2021; Almeida et al., 2020).

A regulação da biogênese dos CLs pode ser modulada por uma variedade de sinais celulares, incluindo hormônios, nutrientes e mediadores inflamatórios. Um exemplo notável é a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), que estimula a formação de CLs em eosinófilos por meio de sua interação com receptores acoplados à proteína G. Curiosamente, este efeito não é replicado em macrófagos, sugerindo que a biogênese dos CLs pode ser altamente específica para o tipo celular e dependente do contexto fisiológico ou patológico (Bozza et al., 2011; Almeida et al., 2020). Durante infecções bacterianas e parasitárias, como aquelas causadas por *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*, a formação de CLs é mediada pelo receptor Toll-Like 2 (TLR2), mas não pelo TLR4, destacando a importância dos CLs na resposta imunológica inata e na defesa do hospedeiro (D'Avila et al., 2011; Bozza et al., 2021; Almeida et al., 2020).

Além de seu papel no armazenamento de lipídios, os CLs têm sido implicados em processos inflamatórios e na sinalização imunológica. Eles participam ativamente na produção de citocinas e quimiocinas, moléculas que são essenciais para a

comunicação intercelular durante a resposta inflamatória. Essa função dos CLs é particularmente relevante em doenças crônicas inflamatórias, como a aterosclerose e a obesidade, onde a inflamação sustentada contribui para a progressão da doença (D'Ávila et al., 2019; Bozza et al., 2021).

## 2.4 MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO DURANTE INFECÇÕES POR PATÓGENOS INTRACELULARES

Patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG sobrevivem e se replicam dentro de células do sistema imunológico, como os macrófagos, induzindo mecanismos de escape. Um desses mecanismos envolve a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) mediada pela via de sinalização do receptor nuclear PPAR $\gamma$ , entre outras atividades (Almeida et al., 2020; Bozza et al., 2021). A modulação do metabolismo lipídico, aliada ao papel crucial da ativação de PPAR $\gamma$  na formação de CLs e na resposta imunológica do hospedeiro, são eventos-chave induzidos por micobactérias para a persistência e sucesso das infecções (D'Ávila et al., 2019).

*Mycobacterium tuberculosis*, o causador da Tuberculose (TB), é outro exemplo de patógeno intracelular que sobrevive e se replica dentro dos macrófagos. Sua capacidade de se adaptar ao ambiente hostil dessas células é essencial para seu sucesso. As micobactérias conseguem subverter a resposta imunológica do hospedeiro interferindo em vias de sinalização, modulando eventos endossomais e fagossomais, e criando um nicho favorável à sua sobrevivência (Bozza et al., 2021; Almeida et al., 2020).

A transmissão da TB ocorre por inalação de pequenas partículas contendo o patógeno, que podem persistir no ambiente por minutos ou horas após a expectoração de indivíduos infectados (Riley et al., 1995). Após a entrada pelas vias respiratórias, o patógeno atinge os pulmões, onde estabelece o foco primário da infecção (Cox R. A. et al., 2003). A infecção pode seguir quatro possíveis desfechos: 1) eliminação dos bacilos pelo hospedeiro; 2) latência, com as micobactérias permanecendo dormentes nos fagócitos; 3) multiplicação imediata, resultando em tuberculose primária; ou 4) reativação da infecção latente (Flynn e Chan, 2001).

A formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos é uma estratégia importante para a sobrevivência e replicação das micobactérias. Macrófagos que

acumulam grandes quantidades de CLs, conhecidos como macrófagos espumosos, são comumente observados em infecções micobacterianas, especialmente em granulomas formados durante a Tuberculose. (Almeida et al., 2020; Bozza et al., 2021; D'Ávila et al., 2019).

*Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* induzem a formação desses corpúsculos através da sinalização via TLR-2 (D'Ávila et al., 2006; Almeida et al., 2009) e CD36, ativando a via de PPAR $\gamma$  (Almeida et al., 2014). A cooperação entre CD36 e TLR2, associada a CD11b e CD14, e a compartimentação da sinalização em "lipid-rafts" desviam a resposta do hospedeiro, resultando no aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$ , promovendo o acúmulo de CLs e modulando a resposta imunológica (Figura 6) (Almeida et al., 2014). Esse mecanismo também é observado na infecção por *M. leprae*, sugerindo uma estratégia intracelular comum para a aquisição de lipídios e a modulação da resposta imune, favorecendo a sobrevivência bacteriana (de Mattos et al., 2012).

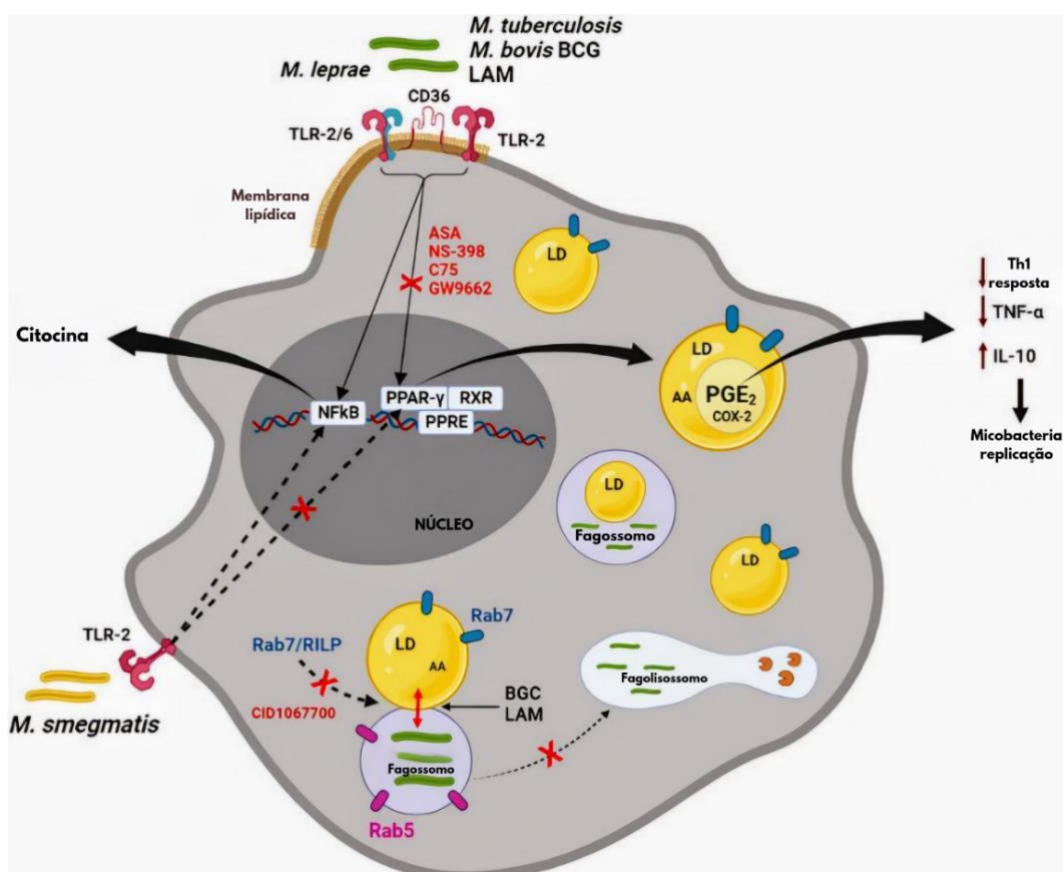


Figura 6- Ativação de macrófagos por micobactérias patogênicas. *M. bovis*, *M. tb*, *M. leprae* e LAM (mas não *M. smegmatis*) podem ativar macrófagos por meio de receptores de membrana, como TLR-2, TLR2/6 e CD36, que estão localizados em balsas lipídicas. Essa ativação resulta na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) via PPAR $\gamma$ . Essa via pode ser bloqueada por agentes como aspirina (ASA), NS-398, C75 e GW9662 (um antagonista seletivo de PPAR $\gamma$ ). Micobactérias patogênicas e não

patogênicas induzem a produção de citocinas, como TNF $\alpha$ , através da sinalização de NF- $\kappa$ B CLs que contêm substrato (AA) e enzima (COX-2), são locais de síntese de PGE<sub>2</sub>, um eicosanoide potente que diminui a resposta imune Th1 do hospedeiro, inibindo TNF $\alpha$  e promovendo a IL-10, facilitando assim a replicação bacteriana. LAM e BCG promovem ativamente a interação entre fagossomos e CLs por um mecanismo dependente de Rab7 e RILP, e essa interação pode ser reduzida pelo inibidor de GTPase Rab7, CID1067700. Rab7, mas não Rab5, é frequentemente encontrado em CLs induzidos por BCG. De maneira geral, CLs podem desempenhar um papel no escape durante a infecção micobacteriana, modulando a síntese de mediadores inflamatórios e interferindo na via endolítica (possivelmente inibindo a maturação do fagossomo para fagolisossomo). Enzimas hidrolíticas no fagolisossomo são representadas como uma imagem de pacman (em marrom). (Adaptado et al.2024) **Fonte:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36909724/>

Além disso, vesículas extracelulares têm sido documentadas como indutoras da formação de corpúsculos lipídicos, participando na modulação do sistema imunológico do hospedeiro (D'Ávila et al., 2021). Essas micropartículas, delimitadas por uma bicamada lipídica, são liberadas no espaço extracelular e podem atuar à distância, promovendo interações entre patógenos e células do hospedeiro (Van Niel et al., 2018; Witwer e Théry, 2019).

Macrófagos J774A.1 infectados com *M. tuberculosis* H37Rv liberam vesículas extracelulares que diferem em tamanho e no conteúdo de fosfatidilserina em relação às vesículas espontaneamente liberadas (S-EV). Essas vesículas apresentam efeitos biológicos distintos: o S-EV reduz a carga micobacteriana e a produção de citocinas in vitro, enquanto ambos os tipos de vesículas diminuem a carga bacteriana pulmonar in vivo (Aguirre et al., 2021). Esses resultados sugerem que as vesículas extracelulares podem melhorar a eficiência do tratamento convencional da Tuberculose, que atualmente tem uma duração mínima de seis meses e é associado a efeitos adversos. Portanto, investigar alternativas terapêuticas que possam reduzir a carga bacteriana e diminuir a duração do tratamento é crucial (García-Martínez et al., 2019).

## 2.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES

### 2.5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Nas últimas décadas, as Vesículas Extracelulares (VEs) têm emergido como importantes mediadoras da comunicação intercelular, desempenhando papéis essenciais em diversos processos fisiológicos e patológicos (Record et al., 2018; Mathieu et al., 2019; Tkach & Théry, 2016). O aumento significativo de publicações científicas sobre VEs em periódicos de renome reflete sua relevância em condições

como envelhecimento, câncer, doenças infecciosas e complicações metabólicas associadas à obesidade (Camino et al., 2020; Hill, 2019; O'Brien et al., 2020; Jayabalan et al., 2017; Gao et al., 2017). Definidas pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) como partículas liberadas naturalmente pelas células, envoltas por uma bicamada lipídica e sem núcleo funcional, as VEs são essenciais para a regulação da sinalização celular (Record et al., 2018; Théry et al., 2018).

As VEs incluem três subpopulações principais: microvesículas, derivadas da membrana plasmática; exossomos, originados de compartimentos intracelulares; e corpos apoptóticos, liberados durante a morte celular programada (Théry et al., 2009; Kowal et al., 2016; Théry et al., 2018). A distinção entre essas subpopulações é baseada em suas características físicas, como tamanho e densidade, bem como marcadores bioquímicos específicos, como CD63, CD81 e anexina V (Théry et al., 2018).

Microvesículas variam de 100 a 1000 nm e são liberadas por diversas células em condições normais e patológicas. Inicialmente vistas como resíduos celulares, agora são reconhecidas como mediadoras da comunicação intercelular, participando de processos como angiogênese (Aoki et al., 2010; Ogawa, 2010). Já os exossomos, que variam de 30 a 150 nm, são derivados de compartimentos endocíticos e carregam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, sendo promissores biomarcadores para diagnósticos clínicos (Figura 7) (Lin et al., 2015; Yu et al., 2016).

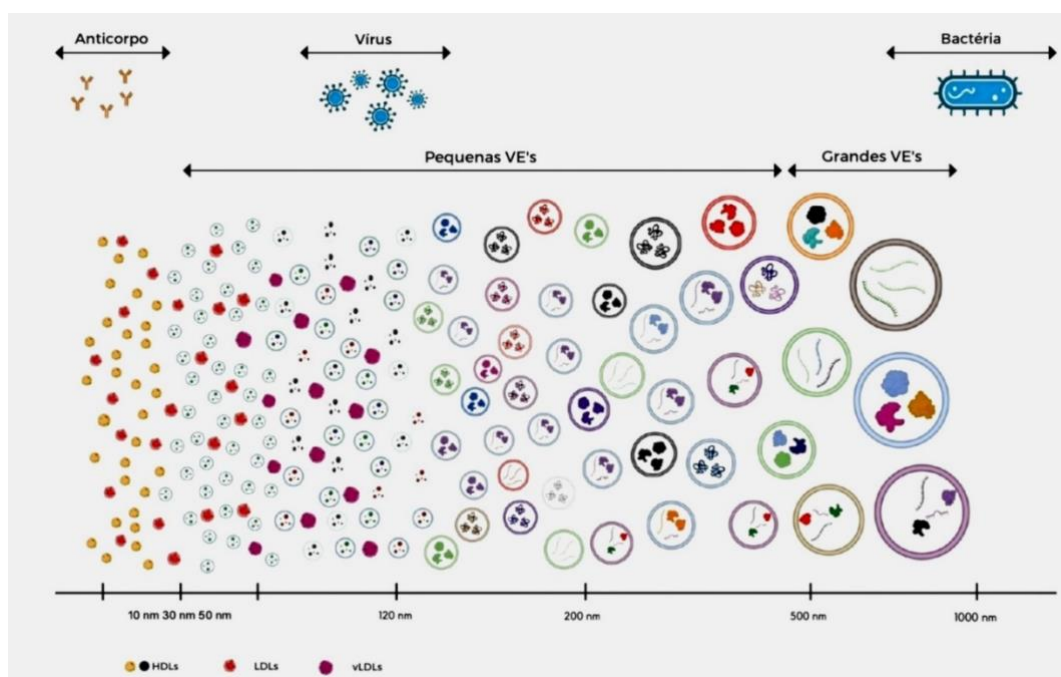


Figura 7-Representação do tamanho e heterogeneidade das vesículas extracelulares (VEs). Lipoproteínas de alta densidade (HDLs), lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e lipoproteínas de muito baixa densidade (vLDLs) são incluídas para comparação. Os tamanhos médios de anticorpos, vírus e bactérias também são mostrados. (Adaptado et al.2024)

Vesículas extracelulares (VEs) como os exossomos e as microvesículas (MVs) podem modificar o fenótipo de células receptoras e induzir respostas biológicas a distância, desempenhando papéis cruciais em processos como a modificação do microambiente tumoral (Gangoda et al., 2015), regulação da inflamação e vigilância imunológica (Théry et al., 2002; Record et al., 2018), atividade antimicrobiana (Oliveira et al., 2010) e proteção em doenças neurodegenerativas e câncer (Gangoda et al., 2015; Clement et al., 2020).

#### 2.5.2- PAPEL DAS MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ADIPÓCITOS E MACRÓFAGOS E EM INFECÇÕES INTRACELULARES

VEs derivadas de adipócitos têm um papel fundamental na interação entre adipócitos e macrófagos, influenciando a inflamação no tecido adiposo e contribuindo para complicações metabólicas associadas à obesidade (Pardo et al., 2018; Camino et al., 2020). Elas podem promover a diferenciação de monócitos em macrófagos, favorecendo a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, dependendo do ambiente celular (Mariette et al., 2013). Particularmente, exossomos derivados de adipócitos contêm lipídios e proteínas associadas a corpúsculos lipídicos, enquanto as microvesículas refletem de forma mais fiel a composição da célula de origem (Flaherty et al., 2019; Pegtel & Gould, 2019).

Além disso, as MVs facilitam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo em condições de obesidade, promovendo um fenótipo pró-inflamatório (Eguchi et al., 2015). Macrófagos pré-estimulados com VEs interferem na sinalização de insulina, exacerbando a resistência à insulina em adipócitos humanos (Mariette et al., 2014; Noren Hooten & Evans, 2020), e exossomos contendo miR-34a podem suprimir a polarização M2 anti-inflamatória dos macrófagos, intensificando a inflamação do tecido adiposo (Pan et al., 2019).

No contexto de infecções intracelulares, as VEs desempenham um papel crucial na modulação da resposta imune. Microvesículas podem transportar RNA e proteínas bioativas que afetam diretamente as células receptoras, alterando vias de

sinalização imunológica (Ogawa et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ismail et al., 2013). Exossomos derivados de macrófagos, por exemplo, carregam microRNAs anti-inflamatórios que suprimem a inflamação e promovem a polarização M2, favorecendo a resolução de processos inflamatórios (Bouchareychas et al., 2020).

Ademais, VEs derivadas de células-tronco mesenquimais (MSC's) demonstraram propriedades anti-inflamatórias e potencial terapêutico em doenças inflamatórias, incluindo a COVID-19 (El Andaloussi et al., 2013; Monsel et al., 2016; Mazini et al., 2021). Exossomos de células-tronco adiposas podem influenciar diretamente a resposta imunológica em infecções virais, incluindo a COVID-19 (SHEN, C. et al., 2020).

Por fim, VEs derivadas de adipócitos também interferem na regulação de vias de sinalização em macrófagos infectados, demonstrando um papel relevante na formação de CLs e no controle de infecções e inflamações (Srinivasa et al., 2021). Portanto, interações como estas entre as VEs, inflamação e metabolismo representam um campo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças causadas por patógeno intracelular como as micobactérias.

### 3 JUSTIFICATIVA

Este estudo visa compreender melhor os mecanismos subjacentes à formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos sob diferentes condições, com foco na influência das microvesículas e exossomos derivados de adipócitos. Além disso, busca explorar como a infecção por *Mycobacterium bovis* pode alterar essas dinâmicas sendo de grande relevância para a compreensão das respostas imunológicas e metabólicas, contribuindo para novas abordagens terapêuticas em doenças infecciosas.

### 4 OBJETIVO

Avaliar a modulação do perfil inflamatório e metabolismo lipídico de macrófagos estimulados ou não com microvesículas e exossomos derivados de adipócitos, e infectados ou não com *Mycobacterium bovis*.

#### 4.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- I. Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados ou não com microvesículas e exossomos derivados de adipócitos e infectados com *M. bovis* ou não.
- II. Avaliar o perfil de polarização de macrófagos através da análise da síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos estimulados ou não com microvesículas e exossomos derivados de adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG.
- III. Avaliar o impacto da ativação de PPAR $\gamma$ , em macrófagos estimulados ou não com exossomos e microvesículas e infectados ou não com *M. bovis* BCG;

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1

Foi utilizada uma linhagem de pré-adipócitos murinos NIH3T3-L1, gentilmente cedidas pela Dra. Clarissa Maya Monteiro, do Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RJ. Para manutenção das células em seu estado não diferenciado (pré-adipócitos), foi utilizado o meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 4,5 g/L de glicose (*Invitrogen*) suplementado com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (*Gibco*) e 10% de soro bovino (*Invitrogen*). As células foram contadas e plaqueadas ( $20 \times 10^3$  células/ml) em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (*Invitrogen*), no qual foram mantidas por 4 dias. Após eles, foi então induzida a diferenciação por meio da adição de meio DMEM 4,5 g/L de glicose suplementado com penicilina e estreptomicina, 10% soro fetal bovino, 1 µM de dexametazona (*Sigma Aldrich*), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (*IBMX*) (*Sigma Aldrich*) e 0,3 unidades/ml de insulina (*Humulin Regular – Lily*) por 3 dias. Foi introduzido então meio DMEM, 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina, 10% de soro fetal bovino e 0,3 unidades de insulina/ml, substituindo 75% de seu volume total de 2 em 2 dias até o final da diferenciação. Considerando o dia -1 corresponde aos pré-adipócitos e o dia 17, aos adipócitos maduros (Figura8). A coleta do sobrenadante foi feita em seguida, sendo usado a fresco ou congelado de acordo com o experimento (Palhinha et al. 2019).

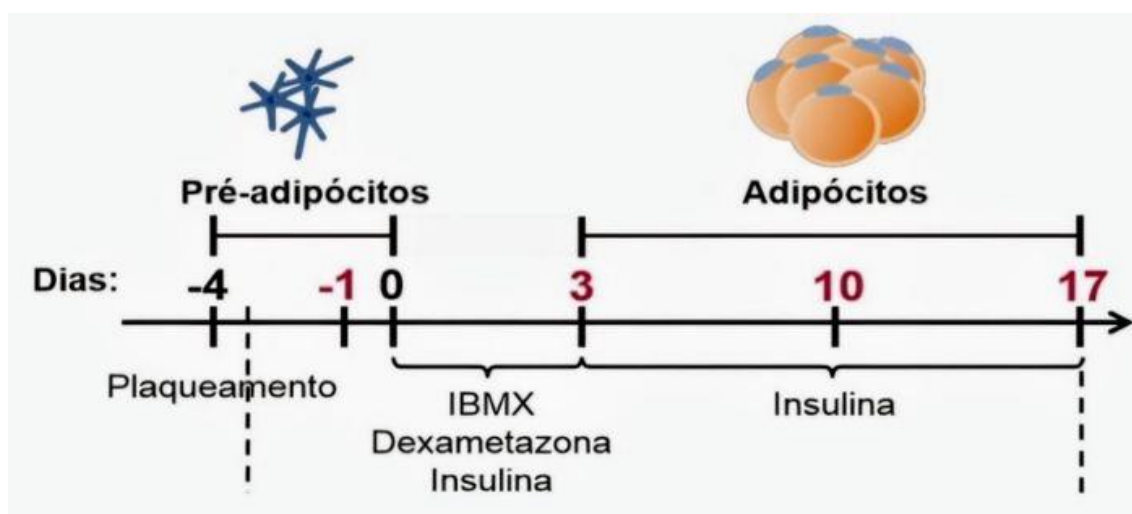


Figura 8- Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1. As células são submetidas ao meio de indução da diferenciação (IBMX, dexametazona, insulina) no dia 0. Após 3 dias são mantidas no meio de maturação (insulina) até o final da diferenciação (Palhinha et al. 2019).

## 5.2 ISOLAMENTO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS

O isolamento de microvesículas e exossomos foi realizado a partir do sobrenadante de adipócitos, armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelado no gelo antes do início do procedimento. Seguindo protocolos de centrifugação diferencial a  $4^{\circ}\text{C}$  para reduzir a degradação proteica, conforme descrito por Momen-Heravi (2017) e Pospichalova et al. (2015), as células foram inicialmente removidas por centrifugação a  $400 \times g$  durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a centrifugações sequenciais a  $2500 \times g$  por 10 minutos e a  $10.000 \times g$  por 30 minutos para eliminar detritos celulares e corpos apoptóticos. O pellet resultante foi ressuscitado em PBS e centrifugado a  $19.000 \times g$  por 45 minutos. O sobrenadante remanescente, após a remoção das microvesículas, foi filtrado através de um filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  e submetido a ultracentrifugação a  $100.000 \times g$  por 70 minutos para a obtenção dos exossomos, seguido de lavagem com PBS e nova ultracentrifugação sob as mesmas condições. As microvesículas e os exossomos foram então alíquotadas em volumes de  $50 \mu\text{l}$  e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para evitar contaminação com vesículas extracelulares (VEs) exógenas, foi adotado um protocolo de depleção de Vs. As amostras de meio RPMI com 2% de soro fetal bovino (SFB) e o sobrenadante de adipócitos após 24 horas de incubação foram processadas para quantificação e análise de VEs, seguindo o mesmo protocolo de isolamento de microvesículas e exossomos. Os pellets finais foram ressuscitados em PBS e analisados por Zeta Sizer. A caracterização das subpopulações de VEs, incluindo microvesículas e exossomos, foi realizada por citometria de fluxo e análise por Zeta Sizer, de acordo com as diretrizes da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV).

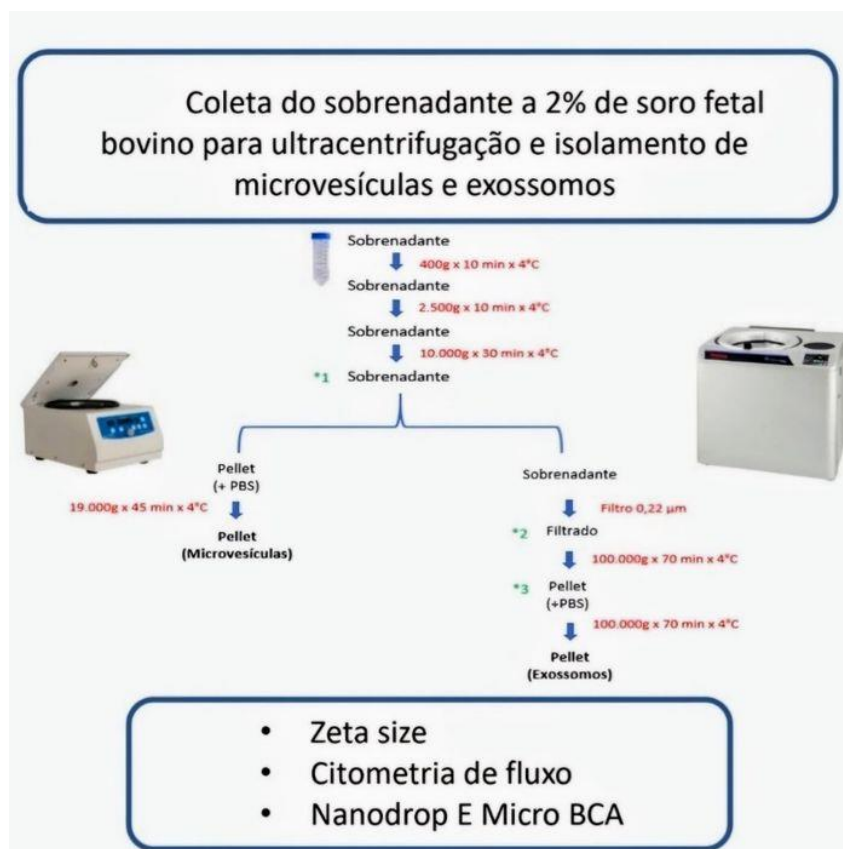


Figura 9- Protocolo de isolamento de microvesículas e exossomos

### 5.3 ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS

A identificação e quantificação de microvesículas foram realizadas através de técnicas como citometria de fluxo, utilizando o equipamento BD FACS Canto II. Após o isolamento por centrifugação, as amostras foram marcadas com Anexina V conjugada ao fluorocromo PE-H. Microesferas de 1 µm foram utilizadas como referência de tamanho, e as medições de fluorescência foram ajustadas para minimizar a autofluorescência, utilizando amostras não coradas como controle. As medições de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) foram registradas em escala logarítmica para a clara detecção das microvesículas, e os dados analisados no software Flow Jo 10.6.1.

O tamanho das microvesículas e exossomos foi determinado utilizando o Zeta sizer Nano SZ, que mede a dispersão da luz por número e intensidade. As amostras foram comparadas sem necessidade de ajuste de pH e armazenadas a 4°C e -80°C. Para análise, as amostras foram descongeladas, agitadas em vortex e diluídas em PBS.

Para avaliar o conteúdo proteico, as alíquotas obtidas da centrifugação foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis utilizando o NanoDrop Lite. A quantificação total de proteínas em microvesículas e exossomos foi realizada com o kit Micro BCA™ Protein Assay, seguindo as instruções do fabricante.

#### 5.4 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

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

#### 5.5 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

A suspensão celular obtida a partir do lavado peritoneal foi diluída 40 vezes em corante Turk (composto de Violeta de Genciana e ácido acético na proporção de 1:100) e submetida à contagem utilizando os quatro quadrantes da câmara de Neubauer.

#### 5.6 ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS DERIVADOS DE ADIPÓCITOS

Microvesículas e exossomos isolados de adipócitos foram descongelados e analisadas quanto ao seu conteúdo proteico utilizando o espectrofotômetro NanoDrop e o kit Micro BCA, seguindo as instruções do fabricante. Para o estímulo dos macrófagos, conforme a literatura foram utilizadas concentrações de 25 µg, 50 µg ou 100 µg de vesículas extracelulares (VEs) em placas de 24 poços. Os macrófagos peritoneais, forma previamente plaqueados por 24hr a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células por poço/ml.

### 5.7 INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG

As células foram infectadas com *Mycobacterium bovis* BCG após 1 h de estímulo dos macrófagos peritoneais com microvesículas ou exossomos. Foi utilizado uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1. Os bacilos da cepa *Moreau*, obtidos na forma de vacina liofilizada em ampolas de 40mg contendo  $80 \times 10^6$  bacilos aproximadamente, onde os bacilos foram diluídos em RPMI estéril e ajustados para uma concentração de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de ampola (UFC/ml). Antes da infecção, os bacilos foram vortexados, sonicados por 5 min e homogeneizados 10 vezes por passagem em seringa 32 G.

Uma hora após a infecção, os poços foram lavados com RPMI contendo 1% de penicilina/estreptomicina, e o meio inicial foi restabelecido (RPMI, 1% de antibiótico e 2% de SFB ou VEs). Os macrófagos foram então incubados por 6, 24 e 48 horas. Após os períodos de incubação, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e adipocinas. Foi realizado uma fixação das células nas lamínulas para posterior coloração visando a contagem de corpúsculos lipídicos.

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

Após o plaqueamento de macrófagos (item 5.4) as lamínulas foram fixadas em formalina 3,7% por 24 h e logo depois, seguiu-se a coloração com Oil-Red-O ou Bodipy para a contagem de corpúsculos lipídicos. A solução estoque de Oil-Red-O (*Sigma Aldrich*) foi preparada a 0,3% (0,3 g de Oil Red O/100 ml de isopropanol (ácido isopropílico) (*Sigma Aldrich*), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente.

No dia da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Após a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de corpúsculos lipídicos, na própria placa de cultura ou a partir da confecção de lâminas permanentes. A solução de formalina 3,7% foi retirada e os poços foram lavados com água destilada. Em seguida, foram adicionados 300 µL da concentração de Oil-red-O, e incubando por 5 min no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequência: 2 x com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%, sendo montadas com meio de montagem contendo DAPI (*VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)*) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células.

A biogênese de corpúsculos lipídicos foi avaliada quanto à infecção com BCG, estímulo com VEs, e tratamento com GW. Os CLs foram contados em 50 células consecutivas, após análise em microscópio de fluorescência Olympus DP73 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100 ou 40x (Olympus, 63 Tokyo, Japan) ou a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100. A morfologia celular dos macrófagos, pré-adipócitos e adipócitos também foi avaliada. As imagens foram analisadas por meio do programa CellSens Dimension.

## 5.9 ESTÍMULO COM GW9662 – ANTAGONISTA DE PPAR $\gamma$

Para avaliar o efeito do receptor PPAR $\gamma$  em macrófagos estimulados por VEs e infectados com BCG, foi utilizado GW9662 (Cayman Chemical, nº 70785) na concentração de 1 µg/ml. Macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/ml/poço) foram tratados com GW9662 uma hora antes da infecção, utilizando RPMI ou sobrenadante contendo VEs. Após lavagem dos poços, o meio com tratamento foi restaurado em conjunto com RPMI ou sobrenadante.

## 5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism®7 (GraphPad Software). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA, seguidos pelo teste t de Student, com nível de significância considerado em  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS NIH3T3-L1

A confirmação da diferenciação de pré-adipócitos da linhagem, foi avaliada a partir das diferenças da morfologia celular, no acúmulo e na hipertrofia de corpúsculos lipídicos, no dia 0 e no dia 17 de diferenciação adipogênica NIH3T3-L1. Características morfológicas típicas de fibroblastos como citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme, além de longos prolongamentos e o fato de estarem alongadas apresentavam-se nas células durante esse período antecedente dos estágios de diferenciação celular (Figura 10A). A partir do 4º dia de indução da diferenciação, foram observadas mudanças na morfologia, com um aumento no número e tamanho dos CLs sinalizando o progresso do processo adipogênico.

No 17º dia, as células exibiam características típicas de adipócitos, como formato arredondado, deslocamento do núcleo para a periferia e acúmulo acentuado de CLs por todo o citoplasma, marcando uma diferenciação completa em comparação aos pré-adipócitos NIH3T3-L1 (Figura 10 B). As análises, realizadas com a coloração Oil Red O (ORO), específica para lipídios neutros, e DAPI para marcação de núcleos, foram avaliadas por microscopia de fluorescência.

Observou-se que, com o avanço da diferenciação, especialmente no 17º dia, houve um aumento significativo no acúmulo de CLs, demonstrando a maturação completa das células. Esse acúmulo foi consideravelmente maior em relação às células em estado como evidenciado pela marcação com ORO (Figura 10 C e D).

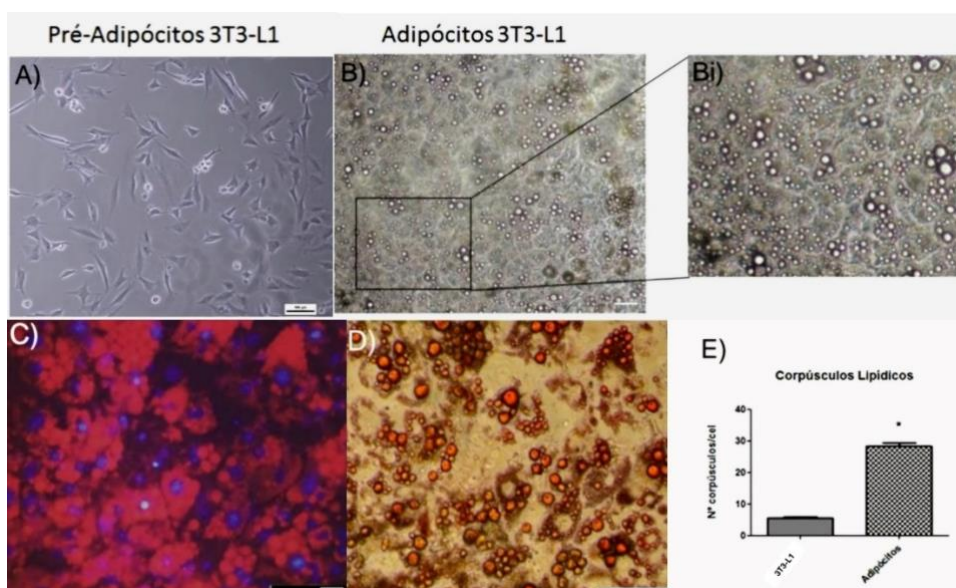


Figura 10- Análise do processo de diferenciação celular. (A) Morfologia de NIH3T3-L1 indiferenciadas, e (B) Morfologia de adipócitos diferenciados, no 17º dia de diferenciação adipogênica, e (Bi) ampliação do campo. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100. (C) Análise por microscopia de fluorescência de adipócitos diferenciados (17 dia); (D) Análise por microscopia de luz de adipócitos diferenciados; (E) Quantificação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3- L1 e adipócitos. As células foram coradas com ORO e em seguida marcadas com corante DAPI para observação dos núcleos. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, escala correspondente a 20 µm, aumento de 20x. (\*) indica diferença significativa entre os grupos. As colunas representam a média ± erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

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

Os adipócitos têm sido sugeridos como possíveis nichos para *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) durante seu estado latente. Assim, compreender a interação entre patógenos virulentos e adipócitos é essencial para elucidar os mecanismos relacionados à persistência da infecção (Neyrolles et al., 2021). No presente estudo, os adipócitos diferenciados da linhagem NIH3T3-L1 foram infectados utilizando uma proporção de 1 bacilo por célula ou 5 bacilos por célula, com o objetivo de avaliar os níveis de produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10. Os resultados demonstraram baixa produção de TNF- $\alpha$ , não sendo encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 11 A). Quanto à produção de IL-10, notou-se que adipócitos produzem essa citocina, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo controle e os grupos infectados com MOI 1:1 ou 5:1 (Figura 11 B). As células foram mantidas em meio RPMI 2% de soro por mais 24 horas após o 17º dia de diferenciação.

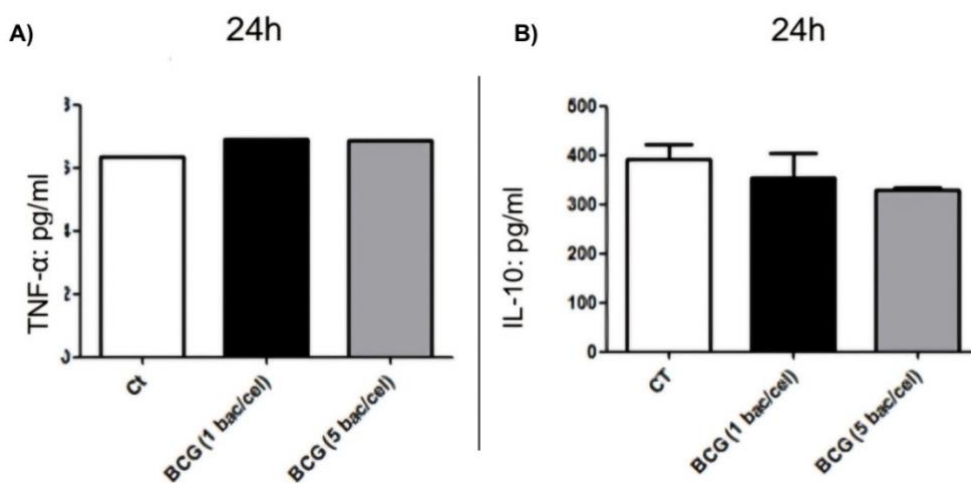


Figura 11- Produção de citocinas por adipócitos infectados. A) Produção de TNF- $\alpha$ . B) Produção de IL-10. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. As colunas representam a média ± erro padrão.

## 6.3 ANÁLISE DE SUBPOPULAÇÕES DE VES

### 6.3.1 CITOMETRIA DE FLUXO

A figura 12 A apresenta a quantificação de microvesículas (MVs) no sobrenadante completo, concentrado e depletado, evidenciando a variação no número de partículas identificadas em cada condição. Além disso, os gráficos que representam o número total de eventos, conforme mostrado na figura 12 B, revelam que, no sobrenadante completo, cerca de 30% dos eventos foram atribuídos às microvesículas isoladas. No entanto, no sobrenadante concentrado, esse valor foi reduzido para 0,85%, o que pode ser explicado pela concentração das microvesículas. No sobrenadante depletado, não houve quantificação significativa de vesículas extracelulares (VEs). Esses resultados, em conjunto, reforçam a eficiência no processo de isolamento das microvesículas.

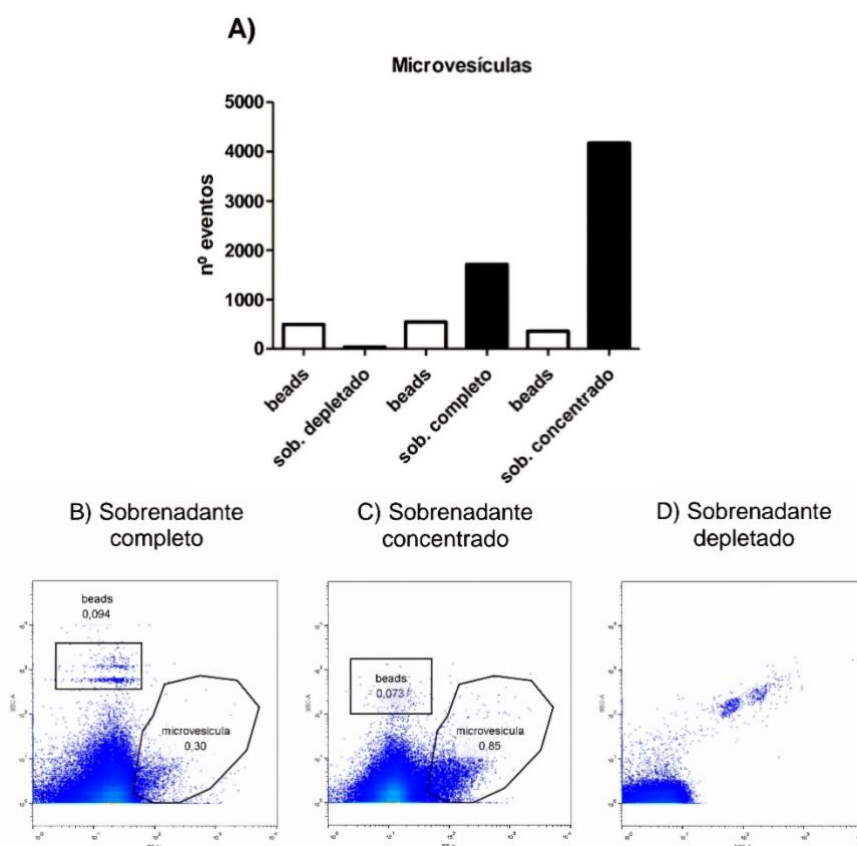


Figura 12- Análise por Citometria de fluxo de VEs. As VEs foram marcadas com anexina. Número total de eventos (A); microvesículas isoladas de sobrenadante completo (B); sobrenadante concentrado (C); e sobrenadante depletado (D). B, C e D representam a porcentagem do número total de eventos. Os gates representam a quantidade de VEs positivas para Anexina V e com tamanho entre 100 e 1000nm.

### 6.3.2 ANÁLISE DO TAMANHO DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS;

As populações de microvesículas e exossomos foram armazenadas em duas condições de temperatura diferentes. A população de exossomos (Figura 13 A) na temperatura de 4°C (Figura 13A'), o seu pico correspondeu a aproximadamente 25% do total de partículas detectadas, enquanto a -80°C (Figura 13A'') esse valor foi de cerca de 30%, indicando que as variações de temperatura não causaram alterações significativas no número de exossomos. No entanto, a qualidade da amostra foi superior na temperatura de -80°C (Figura 13A''). Para as microvesículas o pico de partículas foi de aproximadamente 20% do total a 4°C (Figura 13B') e 30% a -80°C (Figura 13B''). Assim como no caso dos exossomos, não foram observadas diferenças significativas no número de microvesículas em função da temperatura de armazenamento.

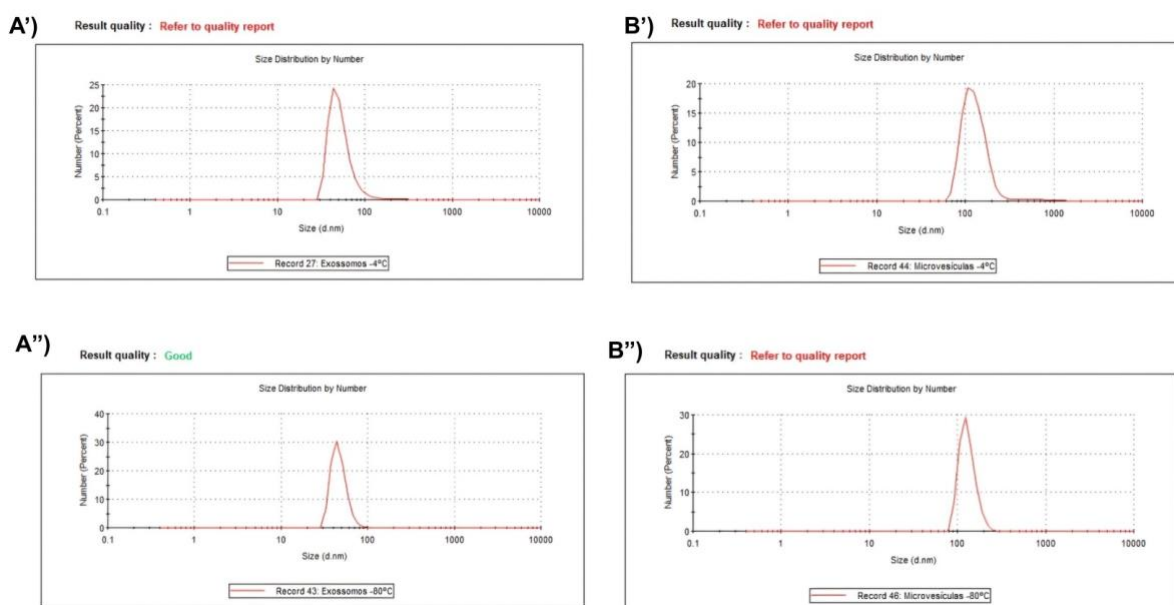


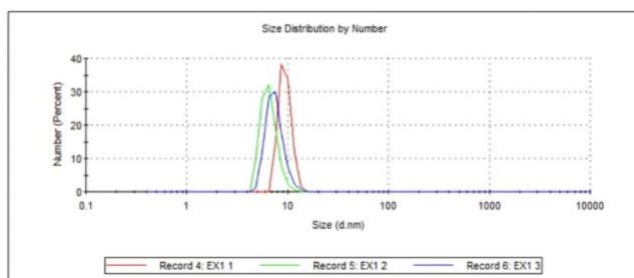
Figura 13- Identificação de subpopulações de VEs, exossomos (A) e microvesículas (B), por número. A' e B' correspondem, respectivamente, a exossomos e microvesículas armazenados a -4° C. A'' e B'' correspondem respectivamente a exossomos e microvesículas armazenados a -80° C.

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

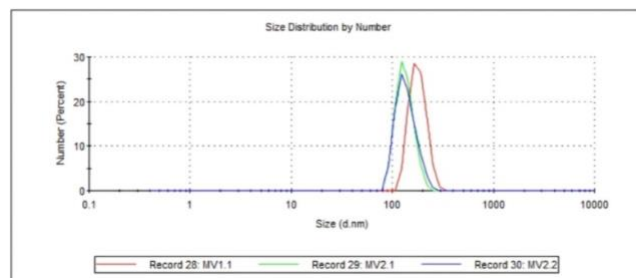
É possível observar que, ao contrário da Figura 14A, que corresponde aos exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos, a Figura 14B, referente ao meio RPMI 2% SFB, apresenta picos aleatórios de partículas no pellet, sem picos característicos de exossomos. O mesmo padrão é observado para as microvesículas: na Figura 14C, identificamos microvesículas isoladas do sobrenadante, enquanto na

Figura 14D não encontramos quantidade suficiente de microvesículas isoladas do meio RPMI 2% SFB. Ademais, ao ser realizado a mesma análise em uma amostra de PBS (Figura 14E), verificamos picos aleatórios semelhantes aos encontrados nas amostras de RPMI 2% SFB, confirmando a ausência de quantidades significativas de microvesículas e exossomos, reforçando a validade do nosso experimento.

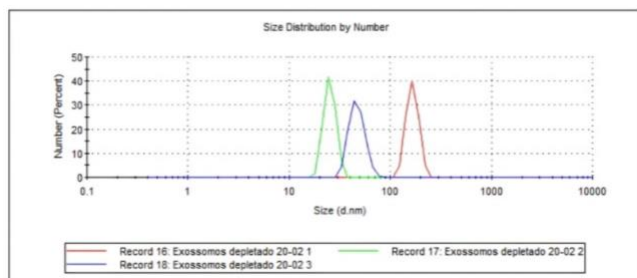
A) Exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos



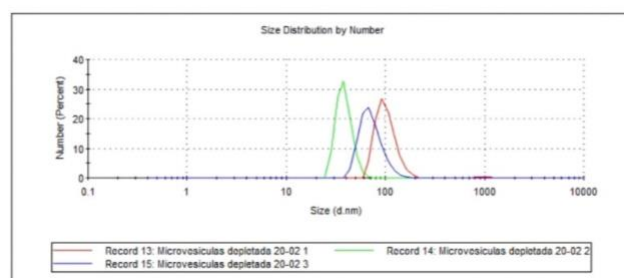
C) Microvesículas isoladas do sobrenadante de adipócitos



B) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB



D) Microvesículas isoladas do meio RPMI 2% SFB



E) Amostra de PBS

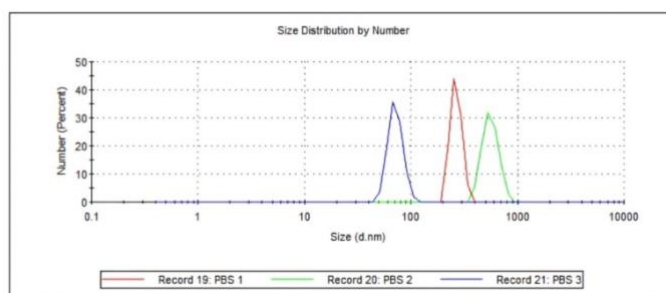


Figura 14- Quantificação e depletação de MVs e Exossomos do meio controle RPMI 2% SFB. A) Exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos; B) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB; C) Microvesículas isoladas do sobrenadante de adipócitos; D) Exossomos isolados do meio RPMI 2% SFB; E) PBS. Todas as amostras foram diluídas 1:9 em PBS.

### 6.3.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO PROTÉICO DAS AMOSTRAS DE VEs OBTIDAS DOS ADIPÓCITOS

Durante o estudo, foi comparado a carga proteica total das alíquotas de microvesículas e exossomos submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento sendo elas -4°C e -80°C por NANODROP (Tabela 1). Os resultados obtidos mostram que a concentração de proteína pouco se alterou com as variações

de temperatura, podendo concluir que ambos os estoques de amostras poderiam ser utilizados como padrões para os experimentos de caracterização e estímulo com VEs.

**TABELA 1**

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

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

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

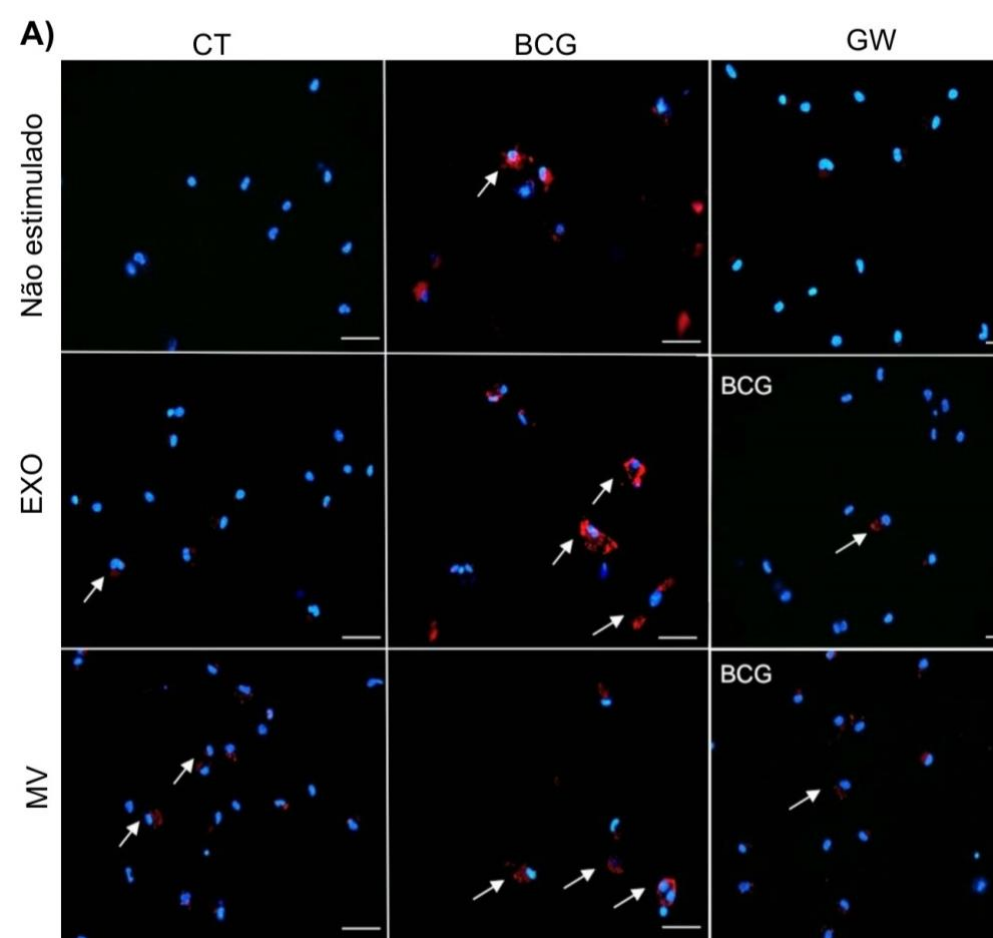
**TABELA 2**

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

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

#### 6.4 BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG E ESTIMULADOS OU NÃO COM MVs OU EXOs

As subpopulações de VEs foram isoladas, purificadas do sobrenadante de adipócitos e utilizadas como estímulo de macrófagos peritoneais infectados ou não com a micobactéria. Após os estímulos foi observado que a infecção com BCG potencializou a formação de CLs na presença de ambos os estímulos com microvesículas ou exossomos e em concentrações de 50  $\mu$ g e 100  $\mu$ g, quando se compara ao grupo BCG não estimulado com VEs. Mesmo o tratamento com MVs ou EXOs na ausência de infecção também já foi capaz de induzir a biogênese de CLs quando se compara ao grupo controle não infectado e não estimulado (Figura 15 e 16).



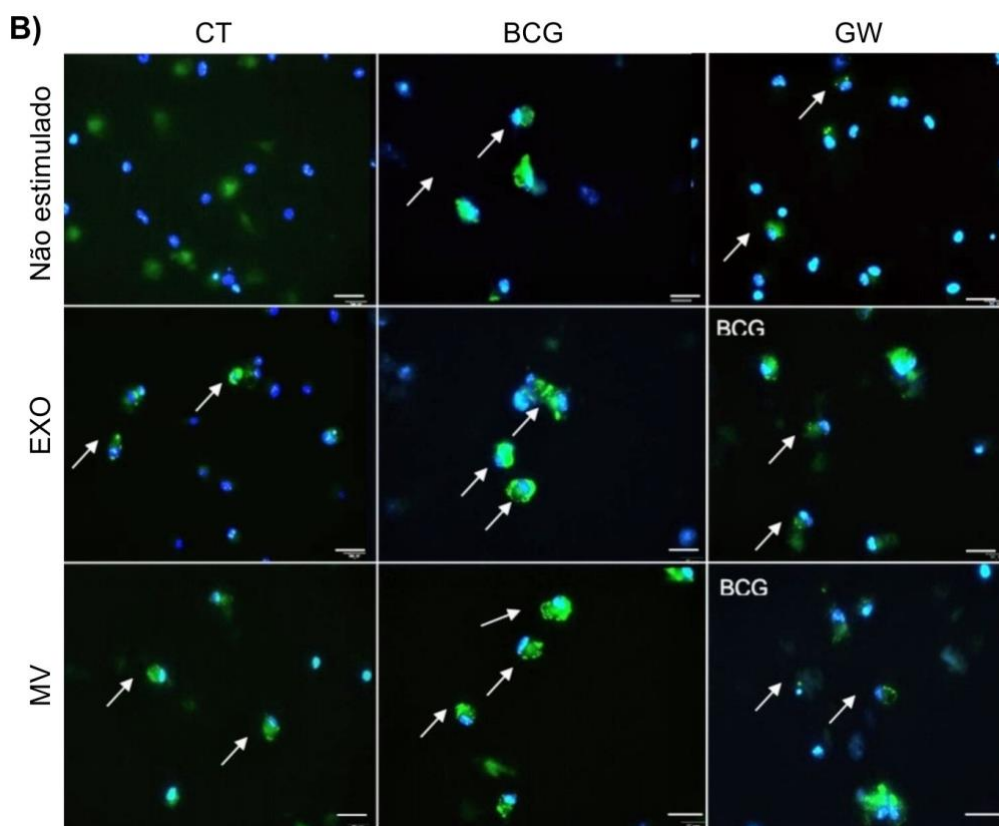


Figura 15- Biogênese de CLs frente ao estímulo com 100 µM Microvesículas (MVs) ou Exossomos (EXOs). (A) indica estímulos com a concentração de 50 µg. (B) indica estímulos com a concentração de 100 µg. Os corpúsculos lipídicos são indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra coloração do núcleo com DAPI. Escala correspondente a 20 µm, aumento de 40x.

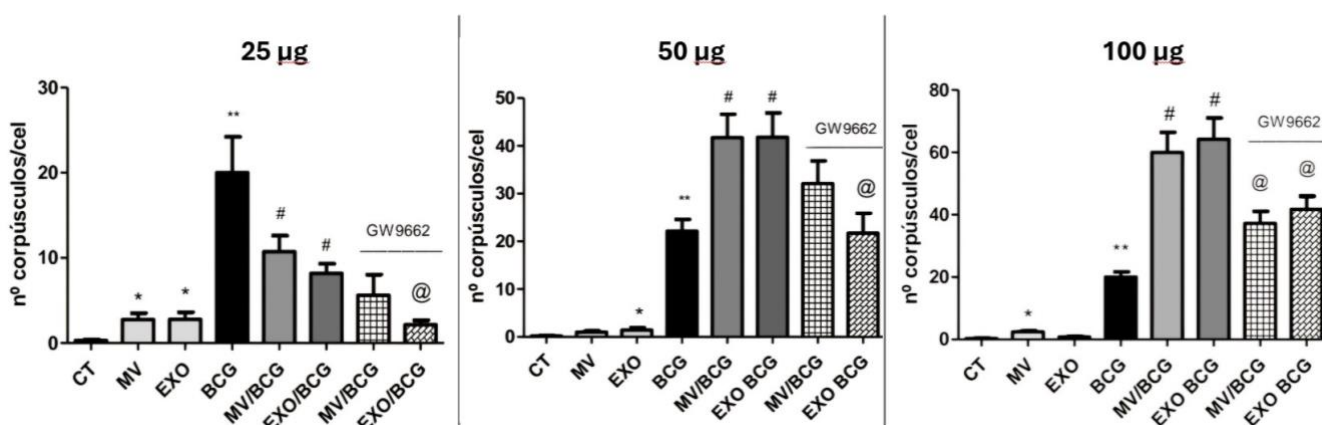


Figura 16- Quantificação de corpúsculos lipídicos após tratamento com microvesículas ou exossomos (25 µg, 50 µg, 100 µg). Foram contados 50 núcleos por n. (\*) diferença significativa entre o grupo tratado e o controle. (\*\*) diferença entre grupos infectados. (#) diferença entre os grupos estimulado com Exossomos e controle; (##) diferença entre os grupos estimulado com microvesículas e controle. As colunas representam a média ± erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

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

Foi investigado o perfil das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 17), após tratamento dos macrófagos peritoneais com microvesículas ou exossomos de adipócitos. A produção de TNF- $\alpha$  diante do estímulo com BCG foi alta, porém na presença de microvesículas ou exossomos modulou negativamente sua produção, nas três concentrações observadas (FIGURA 17). Individualmente, na concentração de 100  $\mu$ g/ml, o estímulo somente com uma das subpopulações foi capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, na mesma proporção que a infecção com BCG. Além disso, os grupos infectados e estimulados com MVs ou EXOs que foram tratados com GW9662, tiveram baixa produção de TNF- $\alpha$ , efeito este que foi similar aos grupos tratados infectados com BCG e tratados com MVs ou EXOs.

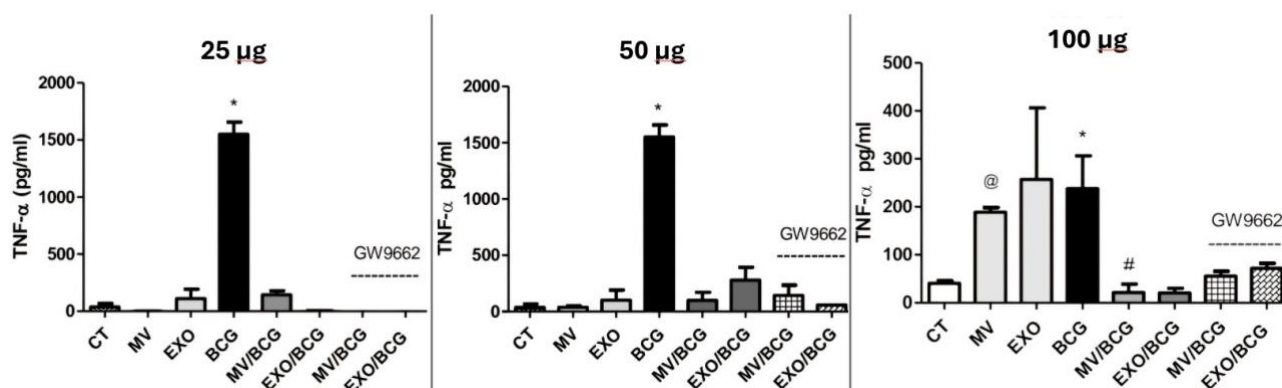


Figura 17- Síntese das citocinas TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com microvesículas ou exossomos em três concentrações distintas. As análises foram feitas através do ensaio de Elisa. (\*) Indica diferença significativa do grupo infectado para o grupo controle. (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença significativa do grupo infectado estimulado para o grupo somente infectado. (#) Indica diferença significativa entre o grupo MV infectado e não infectado. Diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

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

Foi avaliado o perfil da quimiocina KC, que está envolvida na migração de neutrófilos, após o tratamento de macrófagos peritoneais com microvesículas ou exossomos isolados do sobrenadante de adipócitos. Observou-se que o grupo BCG induziu a produção desta quimiocina, que foi modulada negativamente na presença de MVs e EXOs na concentração de 25  $\mu$ g.

Para as concentrações de 50 e 100µg, somente o grupo BCG na presença de EXOs modularam negativamente a produção de KC. Não sendo observadas diferenças significativas quanto ao tratamento com GW, apesar desta droga parecer reverter o papel atribuído às MVs e EXOs. Para melhores conclusões, os experimentos devem ser repetidos (Figura 18).

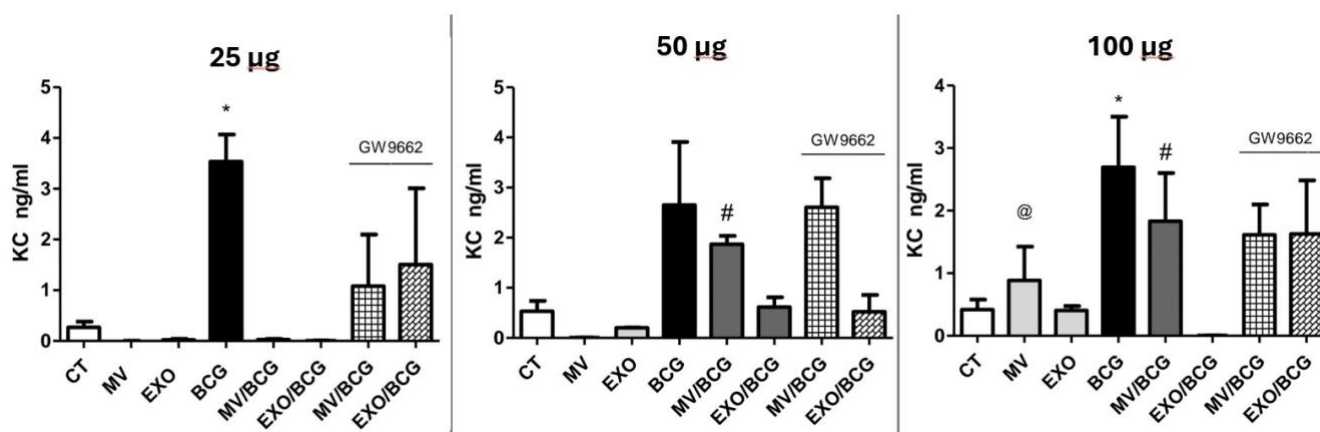


Figura 18- Síntese de citocinas de KC por macrófagos peritoneais frente ao estímulo com 100µM microvesículas ou exossomos e infecção por BCG. (\*\*\*) Indica diferença significativa entre o grupo estimulado com microvesículas e infectado com BCG e o grupo apenas infectado estimulado com MVs. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

## 7 DISCUSSÃO

Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares que regulam a interação entre adipócitos e macrófagos através das VEs e o impacto da infecção por patógenos intracelulares, este estudo buscou aprofundar o entendimento sobre como a inflamação e o metabolismo lipídico são modulados por essa comunicação celular durante a infecção por micobactérias.

Pesquisas anteriores já indicavam que os CLs estão associados ao processo inflamatório, com aumentos em número e tamanho em resposta a estímulos infecciosos, como descrito por Bozza e Bandeira-Melo (2005), Bozza et al. (2009) e D'Avila et al. (2019). Os macrófagos espumosos, que acumulam grandes quantidades de CLs, têm sido caracterizados em infecções micobacterianas, incluindo *M. tuberculosis* (Cardona et al., 2000; Peyron et al., 2008), *M. bovis* BCG (D'Avila et al., 2008; Almeida et al., 2009; 2014) e *Mycobacterium leprae* (Mattos et al., 2010; 2012), como parte de uma estratégia intracelular para adquirir lipídios e modular a resposta imune, favorecendo a sobrevivência do patógeno.

Outrossim, estudos conduzidos com *Mycobacterium leprae* também mostraram que a biogênese de CLs induzida pela infecção está correlacionada com o aumento da secreção de PGE2 e IL-10, bem como com a redução da produção de IL-12 e NO em células de Schwann infectadas (Mattos et al., 2011). Esses achados reforçaram a hipótese de que patógenos intracelulares, como *M. bovis* BCG, utilizam a formação de CLs para escapar das respostas imunológicas, regulando a via de sinalização de PPAR $\gamma$  e promovendo a transrepressão da via de NF- $\kappa$ B (Almeida et al., 2009; 2014).

Adicionalmente, nosso grupo vem destacando a importância da ativação do receptor nuclear PPAR $\gamma$  durante a infecção por *M. bovis* BCG. O antagonista GW9662, um inibidor específico de PPAR $\gamma$ , demonstrou ser capaz de bloquear a ativação dessa via, inibindo a formação de corpúsculos lipídicos e suprimindo os efeitos imunomoduladores induzidos pela infecção (GRÜN et al., 2021). Com isso, sugerimos o papel central da sinalização de PPAR $\gamma$  no metabolismo lipídico dos macrófagos, uma vez que a inibição dessa via impactou diretamente a sobrevivência do patógeno, interferindo na formação de um ambiente imunossupressor favorável à sua replicação (Almeida et al., 2020; Bozza et al., 2021).

Nesse cenário, além de mecanismos mediados por PPAR $\gamma$ , outro fator crucial na comunicação entre adipócitos e macrófagos são as vesículas extracelulares (VEs). Enquanto em infecções por *M. bovis* as VEs desempenham um papel imunomodulador positivo, em infecções causadas por *Trypanosoma cruzi* observamos um efeito contrário (Lovo-Martins et al., 2021). Esses fatores podem modular a resposta imune ao influenciar a biogênese de corpúsculos lipídicos, como observado em infecções por patógenos intracelulares, incluindo *Mycobacterium bovis* BCG (Almeida et al., 2020).

As VEs facilitam a interação entre diferentes tipos celulares, como macrófagos e adipócitos, desempenhando um papel central na comunicação parácrina que contribui para a inflamação do tecido adiposo, o que pode levar a complicações metabólicas (Almeida et al., 2019; D'Avila et al., 2019). Diversos mediadores estão envolvidos na interação entre adipócitos e macrófagos em um ambiente de metainflamação, incluindo citocinas e adipocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , leptina, adiponectina e MCP-1 (Lumeng et al., 2007). Esses fatores atuam de forma sinérgica para promover a inflamação no tecido adiposo, induzindo um perfil pró-inflamatório

nos macrófagos e exacerbando o estado inflamatório crônico associado à obesidade (Almeida et al., 2020; D'Avila et al., 2019).

Nosso grupo, durante esse estudo, buscou investigar se as Vesículas Extracelulares liberadas por adipócitos exerciam algum efeito na função macrofágica durante a infecção ou não por BCG.

Para atender às exigências da ISEV para estudos sobre vesículas extracelulares, estabelecemos métodos específicos de isolamento e caracterização, precedendo as análises funcionais. A citometria de fluxo, uma técnica que permite contar e caracterizar células ou partículas em suspensão, foi utilizada junto à marcação com Anexina V, uma proteína que se liga a fosfolipídios presentes em vesículas apoptóticas, e à padronização com Beads, partículas calibradas que servem como controle de tamanho. Esses métodos permitiram comprovar que o isolamento das microvesículas foi eficiente (Figura 12), com a morfologia das VEs confirmando resultados de estudos anteriores (Lotval, J. et al., 2014).

Para validar o tamanho das subpopulações de VEs, utilizamos o software Zeta Sizer, que mede o tamanho e a distribuição de partículas em solução, e eliminamos possíveis interferências (Figura 13). De acordo com a literatura, a temperatura pode afetar a estabilidade, o número de partículas, sua agregação e função, causando deformidades e modificações no tamanho das vesículas (Van Der Pol, E. et al., 2010). Ao quantificar o número de microvesículas e exossomos e a carga proteica total em diferentes temperaturas de armazenamento após homogeneização, não observamos variações significativas que comprometessem os resultados experimentais (Tabela 1 e 2). Os picos detectados pelo Zeta Sizer confirmaram o tamanho esperado de exossomos e microvesículas, em concordância com análises anteriores realizadas tanto por Zeta Sizer quanto pela técnica de difusão dinâmica da luz (DLS), que analisa o movimento de partículas em solução para estimar seu tamanho (Nolte 'T Hoen, E. N. et al., 2012).

Para avaliar se as VEs podem induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais durante a infecção por *M. bovis* BCG, como observado em infecções por *T. cruzi* (Da Silva, M. S. et al., 2002), estimulamos macrófagos peritoneais *in vitro* com microvesículas e exossomos, e subsequentemente os infectamos com *M. bovis* BCG. Dada a controvérsia na literatura sobre a quantidade

ideal de VEs para estimulação, escolhemos três concentrações diferentes: 25  $\mu$ G, 50  $\mu$ G e 100  $\mu$ G.

Sendo assim, obtivemos que a estimulação de macrófagos com microvesículas e exossomos purificados resultou em um aumento na biogênese de corpúsculos CLs, sendo esse efeito amplificado pela presença da infecção com BCG (Figuras 15 e 16).

As VEs têm ganhado atenção crescente nos últimos anos devido aos seus múltiplos efeitos protetores e reguladores em diversos contextos biológicos e patológicos. Estudos recentes confirmam que as VEs apresentam propriedades anti-inflamatórias em diferentes cenários (Lovo-Martins et al., 2018). Por exemplo, pesquisas demonstraram que essas vesículas desempenham um papel importante na regeneração muscular após lesão, contribuindo significativamente para o reparo tecidual (Cisco et al., 2021). Além disso, as VEs têm mostrado efeitos antimicrobianos em fagócitos, auxiliando no controle de patógenos intracelulares (Oliveira et al., 2020), além de exibirem um papel neuroprotetor e antitumoral, modulando as respostas inflamatórias em doenças neurodegenerativas e câncer (Gangoda et al., 2020).

Outro aspecto importante das VEs é o seu papel como transportadoras de fatores de virulência. Elas têm sido implicadas no transporte de componentes-chave que favorecem a sobrevivência de patógenos em infecções fúngicas, como observado em *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Rodrigues et al., 2020; Gil-Bona et al., 2020). Nessas infecções, as VEs também podem carregar anticorpos, desempenhando um papel crítico na resposta imunológica do hospedeiro.

Além disso, muitos trabalhos documentam a participação das VEs tanto na resposta imune inata quanto adaptativa, ressaltando seu potencial terapêutico na moderação da morbidade e mortalidade associadas a infecções como COVID-19 e HIV (Kormelink et al., 2018; Mazini, Rochette, & Malka, 2021; Srinivasa et al., 2021; Ratajczak et al., 2021). Exossomos derivados de células-tronco mesenquimais adiposas (ADSC's) carregam uma variedade de moléculas com propriedades imunomoduladoras, como TGF- $\beta$ , GDF-11, HGF, NGF, IGF, IL-1, IL-6, TLR-2, TLR-4, INF- $\gamma$  e uma série de miRNAs, todos encapsulados dentro de seus exossomos (Mazini et al., 2019; 2020). Esses componentes demonstram um papel central na imunomodulação, tornando-se alvos promissores para abordagens terapêuticas inovadoras.

Em contrapartida, em infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, as VEs parecem favorecer o parasita (Trocoli Torrechilas et al., 2015). Pesquisas recentes revelaram que a infecção por *T. cruzi* levou a um aumento da parasitemia, maior parasitismo cardíaco e redução dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO), além de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, pelas células do baço (Lovo-Martins et al., 2018). Esses resultados sugerem que as VEs de *T. cruzi* modulam a resposta do hospedeiro para promover a sobrevivência do parasita, possivelmente por meio da interação com corpúsculos lipídicos (Lovo-Martins et al., 2021; Almeida et al., 2021).

Ainda no contexto de infecções, estudos recentes reforçam o papel crucial das VEs, especialmente dos exossomos, na modulação da resposta imune durante infecções micobacterianas. Trabalhos anteriores, conduzidos com exossomos liberados por células J774, THP-1 e RAW264.7 infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium bovis* BCG, demonstraram que esses exossomos podem induzir macrófagos de camundongos a liberar citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e iNOS (Prados-Rosales et al., 2014; Singh et al., 2020).

Esses achados corroboram com os pontos discutidos anteriormente sobre o papel das VEs na comunicação intercelular e na amplificação das respostas inflamatórias. Exossomos presentes no soro de camundongos infectados com *M. bovis* BCG também demonstraram promover a expressão de fatores inflamatórios, evidenciando seu papel ativo no processo inflamatório (Singh et al., 2020).

Adicionalmente, estudos recentes indicam que os exossomos não apenas carregam citocinas e moléculas bioativas, mas também promovem a fosforilação de p38 e I $\kappa$  $\beta$  em macrófagos derivados da medula óssea, sugerindo que essas vias de sinalização estão envolvidas na amplificação da produção de citocinas inflamatórias (Yan et al., 2021). Portanto, os exossomos desempenham um papel fundamental na resposta imune ao ativar essas vias cruciais de sinalização.

Esses achados, em conjunto, destacam o impacto das vesículas extracelulares na modulação do microambiente inflamatório, ressaltando sua importância tanto na amplificação das respostas inflamatórias quanto na adaptação dos patógenos às condições do hospedeiro (Almeida et al., 2021.). Isso reforça o papel crítico das VEs na regulação da inflamação e no metabolismo celular.

Dessa forma, para confirmarmos esse efeito presente na infecção com *M. bovis* BCG, sobre o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos estimulados com VEs, nós dosamos a citocina TNF- $\alpha$ , nas três concentrações de VEs. Nós analisamos que os estímulos com MVs ou EXOs modularam negativamente a secreção de TNF- $\alpha$  nos grupos infectados e estimulados, quando comparado ao grupo infectado somente. No entanto, o estímulo com MVs ou EXOs não associado à infecção também foi capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$ , principalmente na concentração de 100  $\mu$ g/ml (Figura 17).

Nós também investigamos o impacto da inibição da via de PPAR $\gamma$ , mediada pelo antagonista GW9662, na biogênese de CLs e produção de citocinas inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$ , em macrófagos estimulados com MVs e EXOs. Observamos que os macrófagos infectados e tratados com VEs apresentaram uma produção reduzida de TNF- $\alpha$  quando comparados aos grupos não tratados com o GW9662, sugerindo que o bloqueio da via de PPAR $\gamma$  pelo GW9662 pode interferir na capacidade da resposta inflamatória. Esse resultado é consistente com outros estudos que indicam que a inibição de PPAR $\gamma$  modula negativamente a produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina chave na regulação da inflamação (Almeida et al., 2020; Bozza et al., 2021).

A comparação dos grupos infectados com BCG e tratados com MVs ou EXOs reforça a hipótese de que a via de PPAR $\gamma$  desempenha um papel central na resposta a infecção. Em ambos os casos, a produção de TNF- $\alpha$  foi modulada de maneira similar, indicando que o GW9662 efetivamente reduz a produção dessa citocina em contextos de estimulação por VEs. Assim, sugerimos que o PPAR $\gamma$  atue como um modulador da produção de TNF $\alpha$  mediada por vesículas durante infecções por patógenos intracelulares.

A quimiocina KC (CXCL1) é amplamente conhecida por mediar a migração de neutrófilos em resposta a infecções bacterianas, o que pode ser especialmente relevante em culturas estimuladas com BCG e VEs (Zhou and Bréchar, 2022). Estudos mostram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos, tratados com exossomos de células infectadas por *M. tb*, secretam níveis elevados de quimiocinas, induzindo a migração de células imunológicas (Singh et al., 2012).

Sendo assim, nós dosamos os níveis da quimiocina KC produzidos por macrófagos estimulados com VEs e infectados ou não com BCG, sendo observado

que a infecção induziu a produção da quimiocina que foi modulada negativamente frente aos estímulos de MVs e EXOs na concentração de 25 µg, não sendo observado nenhum efeito significativo quanto ao tratamento com GW 9662.

Já nas outras concentrações (50 e 100 µg) a modulação negativa da síntese dessa quimiocina durante a infecção aconteceu apenas na presença dos EXOs. Além disso, as MVs foram capazes de induzir o aumento da síntese de KC na concentração de 100 µg, efeito que foi modulado negativamente na presença da BCG e não foi observado nenhuma modulação após o tratamento com GW9662. (Figura 18).

Tais resultados, demonstram que a produção de quimiocina KC pelos macrófagos infectados com BCG pode ser modulada pela presença de vesículas extracelulares (MVs e EXOs) e esse efeito parece ser dose-dependente. A modulação negativa observada, especialmente com EXOs em concentrações mais elevadas, pode indicar que diferentes tipos de vesículas exercem efeitos distintos sobre a resposta inflamatória durante a infecção (Arteaga-Blanco; Bou-Habib, 2021). Além disso, o fato de que o GW9662 não apresentar efeito significativo em nenhuma das concentrações testadas, pode sugerir que o PPAR não desempenhe um papel na modulação da produção de KC, sendo necessários mais experimentos.

Assim, propomos que microvesículas e exossomos derivados de adipócitos e macrófagos infectados possam contribuir para a ativação celular, regulando o metabolismo lipídico e a secreção de citocinas como  $TNF\alpha$  por um mecanismo de retroalimentação. Além disso, VEs transportam proteínas, fatores de transcrição e organelas que podem alterar o fenótipo das células durante infecções por patógenos intracelulares, influenciando diretamente a resposta imunológica (Bozza et al., 2021).

Adicionalmente, os achados relacionados ao GW9662 trazem importantes contribuições para o entendimento dos mecanismos pelos quais a infecção e a sinalização por VEs podem ser moduladas durante a resposta inflamatória. Além disso, a identificação de PPAR $\gamma$  como uma via de interesse, abre possibilidades para intervenções terapêuticas focadas na modulação das interações entre vesículas extracelulares e macrófagos infectados por patógenos intracelulares no contexto da obesidade (Filip, 2021; Fleury; Martinez; Le Lay, 2023).

## 8 CONCLUSÃO

- A infecção *M. bovis* BCG induziu um aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, potencializada na presença das vesículas extracelulares secretadas de adipócitos em macrófagos peritoneais.
- Podemos sugerir que o PPAR $\gamma$  tem importante função em vias de sinalização celular ativadas por VEs durante a infecção micobacteriana.
- A infecção com BCG induziu a produção de TNF- $\alpha$  que foi regulada negativamente na presença das MVs e EXOs nas diferentes concentrações. Essa produção parece ser modulada por PPAR $\gamma$ .
- A produção de KC foi induzida por BCG, e parece ser modulada negativamente na concentração de 25  $\mu$ g de MVs e EXOs. Já nas outras concentrações apenas o EXOs modulou negativamente a síntese dessa quimiocina, nenhum efeito significativo foi observado na presença do GW.

Assim, estudos futuros ainda são necessários para melhor elucidar esses efeitos das VEs liberadas tanto por adipócitos quanto por macrófagos infectados sobre ativação de células do sistema imunológico para possibilitar o entendimento do seu papel no desenvolvimento de terapias mais eficazes na resolução de infecções associadas a complicações da obesidade (Figura 19).

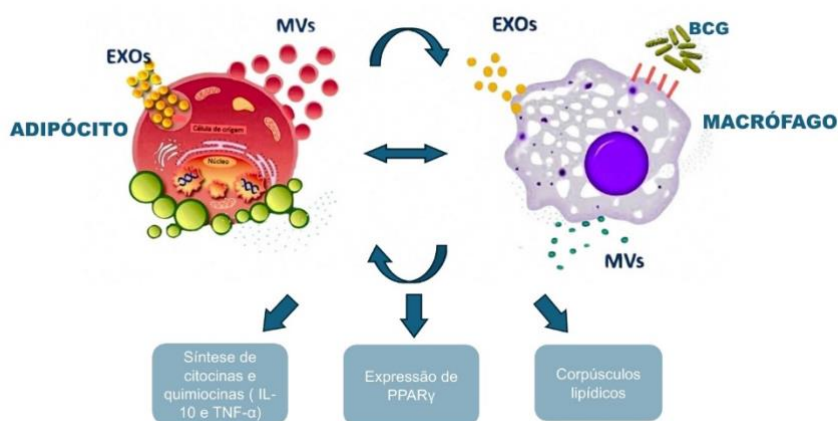


Figura 19- Modulação de macrófagos infectados com *M. bovis* BCG por MVs ou Exossomos. Exossomos e Microvesículas são sugeridos como indutores de alterações no metabolismo lipídico e síntese de citocinas dos macrófagos.

## REFERÊNCIAS

**ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica.** Relatório Anual 2023. São Paulo, 2023.

**AHMADIAN, M.; DUNCAN, R. E.; SALTIEL, A. R. et al.** PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, v. 19, n. 5, p. 557-566, 2013.

**ALIPOOR, S. D.; GARMSIRI, M.; DARSA, M. et al.** Exosomal microRNAs: emerging role in the pathogenesis of intracellular bacterial infections. *Journal of Cellular Physiology*, v. 232, n. 2, p. 2071-2080, 2017.

**ALMEIDA, P. E.; ROCHA, G. M.; MAGALHÃES, K. G. et al.** Lipid bodies in host-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1841, n. 3, p. 486-495, 2014.

**ALMEIDA, P. E.; MAGALHÃES, K. G.; ROCHA, G. M. et al.** Lipid droplets and vesicles in inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1245, 2020.

**ALMEIDA, P. E.; D'AVILA, H.; ROCHA, G. M. et al.** Mycobacterium leprae induces the formation of lipid bodies in Schwann cells: mechanisms and implications for pathogenesis. *Journal of Lipid Research*, v. 50, n. 11, p. 1855-1867, 2009.

**ALMEIDA, P. E.; et al.** Mycobacterium bovis BCG infection induces lipid body formation in macrophages and enhances PGE2 production. *Cell Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 50-61, 2009.

**BELKAID, Y.; HAND, T. W.** Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.

**BLASZCZAK, A. M.; JALILVAND, A.; HSUEH, W. A.** Adipocytes, inflammation, and obesity-associated cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 1-12, 2021.

**BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; MESQUITA, P. R.** Lipid droplets in host-pathogen interactions and immune responses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 108, p. 13-20, 2021.

**CAMINO, D. A.; DE JESUS, B.; COSTA, R. R. et al.** The impact of adipose tissue in metabolic syndrome. *Diabetes Care*, v. 43, n. 1, p. 123-130, 2020.

**CARDONA, P. J.; et al.** Adipose tissue as a safe niche for the persistence of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS ONE*, v. 3, n. 7, e3109, 2000.

**CARDONA, P. J.; LLORENTE, J.; AGUADO, J. M. et al.** Biogenesis of foam cells in tuberculosis granulomas. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 12, p. 2581-2592, 2000.

**CHEN, L.; SHAO, Z.; ZHANG, Y. et al.** Role of PPAR $\gamma$  in inflammation, immunity and metabolism. *Genes & Development*, v. 28, n. 9, p. 761-774, 2014.

**CHOE, S. S.; HYUN, H. K.; KIM, J. B.** Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Journal of Korean Medical Science*, v. 31, n. 4, p. 215-226, 2016.

**CLEMENT, M.; DUTTA, S.; BRIDGES, M. C. et al.** Exosomes and their role in neurodegenerative diseases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1865, n. 7, p. 1-9, 2020.

**COSSETTI, C.; FLETCHER, J.; VECCHIO, L. et al.** Extracellular vesicles as a means of communication between cells in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, p. 3-9, 2014.

**COX, R. A.; KUBERSKI, T.; ARMSTRONG, D.** Coccidioidomycosis: A review. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 17, n. 1, p. 41-57, 2003.

**DA SILVA, M. S.; SANTOS, A. M.; PEREIRA, A. C.; MELO, R. C.; PEIXOTO, R. S.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.** Lipid bodies in peritoneal macrophages during experimental *Mycobacterium bovis* infection: Induction of lipid bodies by a Mycobacterial lipoprotein. *Journal of Immunology*, v. 169, n. 3, p. 6376-6382, 2002.

**D'AVILA, H. D.; COUTINHO, L. A.; BOZZA, P. T. et al.** The role of lipid bodies in the context of tuberculosis infection. *Journal of Immunology*, v. 187, n. 3, p. 346-356, 2019.

**DIAZ, G.; WOLFF, H.; HARTMANN, T. et al.** Proteomic profiling of *Mycobacterium tuberculosis*-derived extracellular vesicles. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 1, p. 11-17, 2016.

**DUARTE, F. O.; BOZZA, P. T.; SOARES, M. R.; BOZZA, F. A.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; MEDEIROS, A. I.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, M. T.** Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflammation*, v. 34, n. 5, p. 705-717, 2011.

**EGUCHI, A.; LIZUKA, M.; OMOTO, Y. et al.** Microvesicles from obese adipose tissue macrophages induce a pro-inflammatory phenotype in lean adipocytes. *Journal of Endocrinology*, v. 223, n. 3, p. 1-10, 2015.

**EL ANDALOUSSI, S.; MÄGER, I.; BREAKFIELD, X. O. et al.** Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, n. 5, p. 347-357, 2013.

**FLAHERTY, S. E.; GRUPP, S. A.; CHENG, Y.** Microvesicles and exosomes in the context of obesity-related inflammation and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 4, p. 1-12, 2019.

**GANGODA, L.; BOUKOURIS, S.; LAI, A. et al.** Extracellular vesicles including exosomes regulate the complexity of the tumor microenvironment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 40, p. 48-58, 2015.

**GAO, Y.; JIA, P.; YU, H.** Obesity and risk of chronic diseases. *Nutrients*, v. 9, n. 1, p. 1-20, 2017.

**GIL-BONA, A.; PARDO, M.; LÓPEZ, D. et al.** Proteomics of *Candida albicans* extracellular vesicles reveals the involvement of virulence factors. *Journal of Proteomics*, v. 170, p. 115-124, 2020.

**HILL, J. O.** Obesity: an epidemic of the twenty-first century. *Obesity Research*, v. 27, n. 4, p. 405-408, 2019.

**ISMAIL, N.; WANG, Y.; BERMUDEZ, L. E.** Macrophage-derived exosomes mediate intercellular communication and modulate immune responses in tuberculosis infection. *Journal of Immunology*, v. 191, n. 3, p. 2498-2509, 2013.

**JAYABALAN, N.; ELASKAR, S.; SHENG, J.** Global perspectives on obesity and public health implications. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, v. 5, n. 2, p. 107-115, 2017.

**JURKOSHEK, K. S.; LEE, S.; LINCOLN, J.** Extracellular vesicles and pathogen invasion: connections and application in disease. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2016.

**KALLURI, R.; LEBLEU, V.** The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, v. 367, p. 1-25, 2020.

**KANDA, H.; TATEYA, S.** Impact of pro-inflammatory cytokines on adipocyte function. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 8, p. 1-25, 2022.

**KLOP, B.; LESTER, R.; LAMPRECHT, A. E.** Lipotoxicity and insulin resistance in obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, v. 29, n. 2, p. 1-10, 2022.

**LEE, J.; ZHANG, T.; DAVIS, J. et al.** Vesicular transport of virulence factors mediates invasive fungal pathogenesis. *Nature Communications*, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2015.

**LIU, Y.; YANG, R.; YU, C. et al.** Mycobacterium tuberculosis-induced release of mesenchymal stem cell exosomes carrying antigens drives adaptive immune responses. *Cell Death & Differentiation*, v. 28, p. 1779-1791, 2021.

**LOTVAL, J.; HILL, A. F.; HOUSER, E. et al.** 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, p. 1-12, 2014.

**LUMENG, C. N.; DELPROPOST, J. B.; SALTIEL, A. R.** Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

**LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R.** Metaflammation: metabolic inflammation in obesity and its effects on metabolic health. *Nature*, v. 444, p. 860-867, 2021.

**MAZINI, L.; ROCCHETTE, L.; MALKA, G.** Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells and application to cell-free therapy in cancer. *Cancer Letters*, v. 501, p. 56-71, 2021.

**MATHIEU, M.; MARTIN-JAULIN, P.; LAVAUULT, M. et al.** Specificities of extracellular vesicles: an emerging paradigm in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 2, p. 1-18, 2019.

**MINISTÉRIO DA SAÚDE.** Vigitel Brasil 2023: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília, 2023.

**MONSEL, A.; HAAS, P.; ROUSSEAU, C. et al.** Therapeutic potential of MSC-derived exosomes in severe inflammatory conditions. *Stem Cells International*, v. 16, p. 1-15, 2016.

**NEYROLLES, O.; HERNANDEZ-PANDO, R.; PEDERSEN, B. et al.** Adipocytes as potential niche cells for *M. tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 799-804, 2021.

**NOREN HOOTEN, N.; EVANS, M. K.** Extracellular vesicles as signaling mediators in metabolic diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 31, n. 8, p. 1-12, 2020.

**NOLTE-'T HOEN, E. N.; BETTER, M.; BOING, A. N. et al.** Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine*, v. 8, n. 5, p. 712-720, 2012.

**O'BRIEN, K. M.; JOHNSON, S.; HARDMAN, C. et al.** The role of exosomes in metabolic disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 31, n. 6, p. 1-12, 2020.

**OLIVEIRA, D. L.; TINÉ, R.; MOREIRA, D. F. et al.** Extracellular vesicles released during parasitic infections as targets for therapeutic intervention. *Parasitology Research*, v. 106, n. 1, p. 1-12, 2010.

**PAN, Y.; ZHANG, Y.; MA, J. et al.** Adipocyte-derived exosomal miRNAs modulate macrophage polarization and function in obesity-related insulin resistance. *Cell Metabolism*, v. 28, n. 1, p. 1-15, 2019.

**PARDO, M.; LUKASOVA, K.; NOGA, M. et al.** Extracellular vesicles and obesity: cross-talk in metabolic disease. *Obesity Reviews*, v. 20, n. 5, p. 1-10, 2018.

**PEGTEL, D. M.; GOULD, S. J.** Exosomes in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 2, p. 1-12, 2019.

**PEYRON, P.; et al.** Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 11, e1000204, 2008.

**PRADOS-ROSALES, R.; BAUDELIN, I.; VALBUENA, P. et al.** Mycobacterial exosomes induce a pro-inflammatory response in the host. *Nature Communications*, v. 5, p. 1-10, 2014.

**RECORD, M.; SILVA, R. P.; FERNANDES, C. L.** Lipid droplets in health and disease. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, n. 4, p. 4184-4192, 2018.

**RODRIGUES, M. L.; ABREU, M.; PALMA, A. S. et al.** Extracellular vesicles and fungal pathogenesis: friends or foes? *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1-12, 2020.

**SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M.** Inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 1-12, 2023.

**SINGH, P. P.; SMITH, V. L.; KARAKOUSIS, P. C. et al.** Mycobacterium tuberculosis-derived exosomes promote macrophage activation and immune responses in host. *Nature Communications*, v. 3, p. 1-10, 2012.

**SMITH, U.; ANDERSSON, L.; NICHOLS, C.** Role of lipids in obesity and insulin resistance. *Journal of Lipid Research*, v. 64, n. 1, p. 1-25, 2023.

**SRINIVASA, S.; WANG, Z.; NOAH, Y. et al.** Exosomes: from biogenesis to therapeutic applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2021.

**SHEN, C.; DORFMAN, R. G.; GUO, W.; SHEN, S.; GUO, Y.; LONG, G.; HU, J.; LIU, J.** Adipose-derived stem cell exosomes: A novel adipokine in obesity-associated diabetes. *Journal of Cellular Physiology*, v. 235, n. 1, p. 718-730, 2020.

**THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E.** Mechanisms of exosome formation and secretion. *Journal of Cell Biology*, v. 211, n. 4, p. 1-12, 2009.

**THÉRY, C.; WITWER, K. W.; AHMED, W. A.** Extracellular vesicles: pathogenic effects and therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 3, p. 284-290, 2018.

**WENSVEEN, F. M.; VALENTA, S.; GREGOR, M. F.** Obesity and immunity: the role of leptin. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 2, p. 222-230, 2015.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Obesity and Overweight. Fact sheet no. 311, Geneva, 2023.

**YAN, B.; YANG, W.; HE, M. et al.** Exosomes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells trigger pro-inflammatory responses in macrophages and activate MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Cell Death & Disease*, v. 12, n. 2, p. 1-12, 2021.

**YU, X.; O'CONNOR, T. W.; GOLDMAN, J. R.** Extracellular vesicles as next-generation drug delivery platforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 104, p. 1-20, 2016.

**ZHANG, Y.; LI, Y.; HUANG, S. et al.** The role of extracellular vesicles in cancer metastasis. *Cancer Letters*, v. 293, n. 2, p. 1-15, 2010.

**ZHOU, B.; BRÉCHARD, S.** CXCL1: a versatile chemokine for neutrophil activation and recruitment in tissue inflammation. *Journal of Immunology*, v. 210, n. 4, p. 2150-2162, 2022.

**FRANCO, M. A.; NEYROLLLES, O.** The role of lipid droplets in host-pathogen interactions. *Journal of Immunology*, v. 202, n. 1, p. 1-8, 2020.

**ALMEIDA, P. E.; MAGALHÃES, K. G.** The impact of obesity and lipid metabolism in infections by intracellular pathogens. *Annual Review of Immunology*, v. 40, n. 5, p. 95-110, 2021.

**JURKOSHEK, K. S.; LINCOLN, J.** Exploring extracellular vesicles in infection and inflammation. *Journal of Immunology*, v. 219, n. 1, p. 1005-1010, 2023.

**COSSETTI, C.; FLETCHER, J.** The potential therapeutic application of exosomes in immune regulation. *Annual Review of Immunology*, v. 217, p. 502-515, 2020.

**O'BRIEN, J. L.; HARDING, C. V.** Tumor-derived extracellular vesicles in cancer metastasis. *Nature Cancer Reviews*, v. 210, n. 1, p. 123-140, 2020.

**HILL, J. O.** Obesity research: trends and directions. *Obesity Reviews*, v. 46, n. 1, p. 35-46, 2021.

**ALMEIDA, K. G.; MAGALHÃES, P.** Host-pathogen interactions in obesity. *Trends in Immunology*, v. 30, n. 4, p. 312-325, 2022.

**HILL, P.; ROGERS, S. A.; MARION, J.** Extracellular vesicles in health and disease. *Journal of Immunology*, v. 230, n. 7, p. 255-267, 2023.

**WALTHER, T. C.; FARESE, R. V.** The life of lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1791, n. 6, p. 459-466, 2009.

**FILIP, R.** An update on the role of extracellular vesicles in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis and inflammatory bowel diseases. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 3202, 2021.

**FLEURY, A.; MARTINEZ, M. C.; LE LAY, S.** Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 107256, 2023.

**LOVO-MARTINS, M. I.** et al. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and elicit lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 896, 2018.

**MATTOS, K. A.** et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 3, p. 371-384, 2011.

**GRÜN, M.** et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  antagonist 2-Chloro-5-Nitro-N-Phenylbenzamide (GW9662) triggers perilipin 2 expression via PPAR $\delta$  and induces lipogenesis and triglyceride accumulation in human THP-1 macrophages. *Molecular Pharmacology*, v. 100, n. 4, p. 582-593, 2021.