VIVIAN ALMEIDA PASCHOAL

**MTOR COMPLEXO 1 ATENUA A RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE MACRÓFAGOS E INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO
ASSOCIADAS À OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

VIVIAN ALMEIDA PASCHOAL

**MTOR COMPLEXO 1 ATENUA A RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE MACRÓFAGOS E INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO
ASSOCIADAS À OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: William Tadeu Lara Festuccia

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Paschoal, Vivian Almeida.

mTOR complexo 1 atenua a resposta pró-inflamatória de macrófagos e inflamação do tecido adiposo associadas à obesidade / Vivian Almeida Paschoal. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle molecular do metabolismo e inflamação.

Versão do título para o inglês: mTOR complex 1 attenuates the proinflammatory macrophage response and adipose tissue inflammation associated with obesity.

1. mTOR 2. Obesidade 3. Macrófagos 4. Tolerância à glicose 5. Inflamação do tecido adiposo I. Festuccia, Prof. Dr. William Tadeu Lara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0135/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vivian Almeida Paschoal.

Título da Tese: mTOR complexo 1 atenua a resposta pró-inflamatória de macrófagos e inflamação do tecido adiposo associadas à obesidade.

Orientador(a): Prof. Dr. William Tadeu Lara Festuccia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA-ICB/USP - 056/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 98/10/CEUA, datado de 29.09.10 e por solicitação do Prof. Dr. Rui Curi, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Vivian Almeida Paschoal** ao Projeto de Pesquisa "Controle da expressão gênica por receptores nucleares", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 15 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

RESUMO

PASCHOAL, V. A. **mTOR complexo 1 atenua a resposta pró-inflamatória de macrófagos e inflamação do tecido adiposo associadas à obesidade**. 2015. 96 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Obesidade e resistência a insulina estão associadas com um aumento na atividade do sensor de nutrientes e fator de crescimento complexo 1 da mTOR no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. Por mecanismos ainda desconhecidos, a inibição farmacológica de mTOR com rapamicina exacerba a intolerância glicose associada a obesidade. Assim, em um primeiro estudo nós testamos a hipótese de que a intolerância a glicose induzida pelo tratamento com rapamicina *in vivo* ocorre em parte devido ao desenvolvimento de processo pró-inflamatório nos tecido adiposo. Para isto, camundongos C57BL6 alimentados com dieta rica em lipídios (60%) tratados com veículo (0,1% Me₂SO, 0,2% metilcelulose) ou rapamicina (2 mg/ kg/ dia, gavagem) por 30 dias, foram avaliados para ganho de peso, adiposidade, tolerância a glicose e inflamação do tecido adiposo. Posteriormente, investigamos também o efeito da inibição farmacológica de mTOR na polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2, metabolismo e atividade secretória e fagocítica *in vitro*. Apesar de não alterar o peso dos animais, o tratamento com rapamicina exacerbou a intolerância a glicose e inflamação do tecido adiposo induzida por dieta hiperlipídica como evidenciado pelo aumento na porcentagem de macrófagos residentes com fenótipo M1 pró-inflamatório e linfócitos T citotóxicos naives e ativados, assim como, os níveis de mRNA de CD11b, CD86, TNF-alfa, IL-6, MCP1, NLRP3, ASCPyCARD, DUSP6 e IL-1beta no tecido adiposo. *In vitro*, a inibição dos complexos 1 e 2 da mTOR com rapamicina e torina induziu polarização espontânea de macrófagos para o fenótipo M1 e aumentou a atividade fagocítica de macrófagos M0, mas reduziu a polarização para M2 induzida por IL-4 e IL-13, a secreção de TNF-alfa por macrófagos M1 e a conversão de glicose em lactato. Todavia, o tratamento com torina, mas não rapamicina, reduziu tanto a secreção de IL-6 e IL1-beta e a produção de óxido nítrico por macrófagos M1, quanto a oxidação e incorporação de ácido palmítico em TAG em macrófagos M2, e a oxidação de glicose em macrófagos M0 e M1. Em um segundo estudo, com o objetivo de melhor caracterizar o envolvimento do complexo 1 da mTOR no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associado a obesidade, camundongos com ativação constitutiva do complexo 1 da mTOR exclusivamente em células mielóides (deleção de TSC1 via sistema Cre-lox), foram desafiados com dieta hiperlipídica por 8 semanas e avaliados para diversos parâmetros metabólicos e inflamatórios. O efeito da ativação constitutiva de mTORC1 na polarização de macrófagos *in vitro* também foi investigado. Camundongos com superativação de mTORC1 em células mielóides foram protegidos do ganho de peso, adiposidade, intolerância a glicose e a insulina induzidos pela ingestão de dieta hiperlipídica. A superativação de mTORC1 induziu um aumento da polarização de macrófagos para o fenótipo M2, mas não para o fenótipo M1. Este efeito foi bloqueado pelo tratamento com rapamicina e torina. Em conjunto, nossos dados indicam que a atividade do complexo 1 da mTOR atenua o desenvolvimento da

inflamação do tecido adiposo associada a obesidade por um mecanismo que envolve a maior polarização de macrófagos para o fenótipo M2.

Palavras-chave: mTOR. Obesidade. Tolerância à glicose. Inflamação do tecido adiposo. Macrófagos.

ABSTRACT

PASCHOAL, V. A. **mTOR complex 1 attenuates the proinflammatory macrophage response, and adipose tissue inflammation associated with obesity.** 2015. 96 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Obesity and insulin resistance are associated with an increase in the activity of mTOR complex 1 in adipose tissue, liver and skeletal muscle. Through unknown mechanisms, pharmacological inhibition of mTOR with rapamycin exacerbates the glucose intolerance associated with obesity. Therefore, we tested the hypothesis that the exacerbation of glucose intolerance induced by rapamycin treatment *in vivo* is, at least in part due to the development of inflammatory process in adipose tissue. For this, C57BL6 mice fed with high fat diet (60% of calories as fat) treated with vehicle (0.1% Me₂SO, 0.2% methylcellulose) or rapamycin (2 mg/ kg/ dia, gavage) during 30 days were evaluated for body weight, adiposity, glucose intolerance and adipose tissue inflammation. We also investigated the effects of mTOR pharmacological inhibition in macrophage polarization to M1 and M2, metabolism, cytokine secretion and phagocytosis *in vitro*. Despite the absence of changes in body weight gain, rapamycin treatment exacerbated the glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by high fat feeding as evidenced by the increase in the percentage of M1 macrophage and lymphocytes T cytotoxic naive and activated and mRNA levels of CD11b, CD86, TNF-alpha, IL-6, MCP1, NLRP3, ASCPyCARD, DUSP6 and IL-1beta in adipose tissue. *In vitro*, inhibition of mTOR complexes 1 and 2 with rapamycin and torin increased macrophage spontaneous polarization to M1 and M0 macrophage phagocytosis, but reduced the M2 polarization induced by IL-4 and IL-13, M1 secretion of TNF-alpha and glucose conversion into lactate. Treatment with torin, but not rapamycin, reduced M1 macrophage IL-6 and IL1-beta secretion and nitric oxide production, as well as, M2 macrophage fatty acid oxidation and incorporation in triacylglycerol, and M0 and M1 glucose oxidation. In a second study, aiming to better characterize the involvement of mTOR complex 1 in the development of adipose tissue inflammation associated with obesity, mice with a constitutive activation of mTOR complex 1 in myeloid cells (TSC1 deletion by the Cre-Lox) were challenged with a high fat diet for 8 weeks and evaluated for several metabolic parameters and inflammation. The effects of constitutive activation of mTOR complex 1 upon macrophage polarization *in vitro* were also investigated. Mice with a constitutive activation of mTOR complex 1 in myeloid cells were protected from body weight gain, fat accretion, glucose and insulin intolerance induced by high fat diet feeding. mTOR complex 1 overactivation also promoted macrophage polarization to a M2 phenotype, such an effect that was blocked by rapamycin and torin. Altogether, our findings indicate that the activity of mTOR complex 1 attenuates the development of adipose tissue inflammation induced by high fat feeding, through a mechanism that involves a higher polarization of macrophages to anti-inflammatory M2 phenotype.

Keywords: mTOR. Obesity. Glucose tolerance. Adipose tissue inflammation. Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Figura esquemática da via da mTOR.	23
Figura 2 - Imagem ilustrativa de gel de agarose usado para a genotipagem.	33
Figura 3 - Representativos do conteúdo de proteínas envolvidos na via da mTOR de camundongos C57BL6 tratados com veículo ou rapamicina.	44
Figura 4 - Ganho de peso, Consumo alimentar, Eficiência energética, Peso do tecido adiposo, Teste de tolerância à glicose (GTT) e Área sob a curva do GTT de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou HFD.	46
Figura 5 - Porcentagem de macrófagos totais, Macrófagos com fenótipo M1, Macrófagos com fenótipo M2, Células dendríticas, Células dendríticas ativadas, Neutrófilos, Linfócitos B, Linfócitos T, Linfócitos T helper, Linfócitos T helper ativados, Linfócitos T citotóxicos e Linfócitos T citotóxicos ativados da fração estroma-vascular do tecido adiposo de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou HFD tratados com veículo ou rapamicina.....	48
Figura 6 - Porcentagem de linfócitos T, Linfócitos T helper, Linfócitos T helper ativada D) Linfócitos T citotóxicos, Linfócitos T citotóxicos ativados do linfonodo de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou HFD.	49
Figura 7 - Expressão gênica de marcadores inflamatórios no tecido adiposo de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou HFD tratados com veículo ou rapamicina.....	51
Figura 8 - Conteúdo de proteínas envolvidas na via da mTOR em macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO.....	56
Figura 9 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 na ausência de estímulo para polarização, na polarização para M1 e na polarização para M2, após tratamento com DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas.....	58
Figura 10 - Produção de nitrito e fagocitose por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2	59
Figura 11 - Secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2.	61
Figura 12 - Produção de lactato e oxidação da glicose por macrófagos M0, M1 e M2 ..	62

Figura 13 - Produção de CO ₂ e TAG por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2.	62
Figura 14 - A Ganho de peso, consumo alimentar e eficiência energética em camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas.	64
Figura 15 - Peso dos tecidos adiposos: retroperitoneal, inguinal, epididimal e marrom; fígado e baço de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF durante 8 semanas.	65
Figura 16 - Teste de tolerância à glicose (GTT), Área sob a curva, Teste de intolerância à insulina (ITT) e Velocidade de decaimento da glicemia no ITT (KITT) em camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF durante 8 semanas.....	66
Figura 17 - Porcentagem de macrófagos totais, Macrófagos com fenótipo M1, Macrófagos com fenótipo M2, Linfócitos T, Linfócitos T helper, Linfócitos T helper ativados, Linfócitos T citotóxicos, Linfócitos B, Células dendríticas, Células dendríticas ativadas, Neutrófilos da fração estroma-vascular do tecido adiposo epididimal de camundongos controles (MaTSC1WT) e com superativação de mTORC1 em macrófagos (MaTSC1KO) alimentados com dieta controle ou dieta HF durante 8 semanas.....	68
Figura 18 - Ganho de peso e teste de tolerância à glicose de camundongos TSC floxeados transplantados com células de animais MaTSC1WT ou MaTSC1KO alimentados com dieta HF por no mínimo 4 meses.....	69
Figura 19 - Porcentagem de macrófagos totais, Macrófagos com fenótipo M1, Macrófagos com fenótipo M2, Linfócitos, Linfócitos T helper, Linfócitos T citotóxicos, Linfócitos B, Células dendríticas, Células dendríticas ativadas Neutrófilos da fração estroma-vascular do tecido adiposo de camundongos TSC floxeados transplantados com células de camundongos controles (MaTSC1WT) ou com superativação de mTORC1 em macrófagos (MaTSC1KO) alimentados com dieta HF durante 8 semanas.	71

Figura 20 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO sem estímulo para polarização, na presença de DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas.	72
Figura 21 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO após estímulo para polarização em M1 associado a tratamento com DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas.....	73
Figura 22 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO após adição de estímulo para polarização em M2 (IL-4 e IL-13) associado a tratamento com DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas.....	73
Figura 23 - Produção de nitrito por macrófagos M0, M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de macronutrientes das dietas controle e hiperlipídica.....	32
Tabela 2 - Lista de anticorpos de superfície usada na marcação de células nos experimentos de citometria de fluxo.....	36
Tabela 3 - Sequências dos primers sense e antisense utilizados no qPCR.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP: *4E binding protein*

AGC: Proteína serina/treonina quinase

Akt: Treonina proteína quinase (*threonine-protein kinase*)

AMPK: *Activated protein kinase*

ATG13: *Autophagy-related protein 13*

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: *Bovine serum albumin*

Deptor: Proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP (*DEP domain containing MTOR-interacting*)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

dNTP: *Deoxynucleotide triphosphates*

DT2: Diabetes tipo 2

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

eIF4E: *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

FcBlock: *Fc Receptor Blocking*

FKBP12: *12 kD FK506 binding protein*

FOXP3: *Forkhead box P3*

GLUT4: Transportador de glicose 4

GTT: Teste de tolerância a glucose

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HFD: Dieta rica em lipídeos

IFN- γ : Interferon γ

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IKK β : I κ B quinase β

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
IL-18: Interleucina 18
IL-23: Interleucina 23
IMC: Índice de massa corpórea
IRS-1: Receptor de insulina-1
ITT: Teste de tolerância a insulina
JNK: Janus quinase
KITT: Velocidade de decaimento da glicemia após injeção de insulina
LPS: Lipopolissacarídeo
M-CSF: *Macrophage Colony Stimulating Factor*
M0: Macrófago basal, sem estímulo para polarização
M1: Macrófago com fenótipo 1
M2: Macrófago com fenótipo 2
MaTSC1KO: Macrófagos com deleção de TSC1
MaTSC1WT: Macrófagos controles sem deleção de TSC1
MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos (*Monocyte chemoattractant protein-1*)
mLST8: *mLST8 MTOR associated protein, LST8 homolog*
mSIN1: *Mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein*
mTOR: *Mammalian target of rapamycin*
NFkB: Fator nuclear kappa B
PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase-1*
PI3K: Fosfoinositol 3 quinase (*phosphoinositide 3-kinase*)
PIP3: *Phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate*
PKC: Proteína quinase C
PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PRAS40: *Proline-rich Akt substrate of 40 kilodaltons*
PRR5: Proteína observada com Rictor-1 (Protor-1)
Rags: *Ras-related. GTPase*

Raptor: *Regulatory associated protein of mTOR*

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

Rictor: *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro

Rpm: Rotações por minuto

S6K: p70 S6 quinase 1

SGK: Quinase regulada por soro e glicocorticóides

SREBP-1: *Sterol regulatory element-binding transcription factor 1*

TAG: Triacylglycerol

Th1: Linfócitos T-helper 1

Th2: Linfócitos T-helper 2

Th17: Linfócitos T-helper 17

TLR-4: Receptor do tipo Toll 4 (*Toll-Like Receptor 4*)

TNF- α : Fator de necrose tumoral

TSC1: *Tuberous Sclerosis 1*

UA: Unidade arbitrária

ULK1: *Unc51-like kinase 1*

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Obesidade.....	17
1.1.1	<i>Inflamação crônica interliga obesidade e resistência à insulina.....</i>	18
1.2	mTOR	21
1.2.1	<i>Funções biológicas dos complexos 1 e 2 da mTOR.....</i>	23
1.2.2	<i>Inibidores farmacológicos de mTOR.....</i>	25
1.2.3	<i>mTOR e sistema imune.....</i>	26
1.2.4	<i>mTOR e resistência à insulina</i>	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Os objetivos específicos investigados foram	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Animais	31
3.2	Genotipagem	32
3.3	Teste de tolerância a glicose (GTT) e área sob a curva	33
3.4	Teste de tolerância a insulina (ITT) e KITT	33
3.5	Peso dos animais, consumo alimentar e eficiência energética	34
3.6	Calorimetria indireta	34
3.7	Eutanásia	34
3.8	Células imunes residentes no tecido adiposo	34
3.9	Marcação celular para o citômetro de fluxo (FACS).....	35
3.10	Imunofenotipagem	36
3.11	Macrófagos derivados da medula óssea e polarização	37
3.12	Análise da expressão gênica por PCR.....	38
3.13	PCR quantitativo	38
3.14	Western blotting	39
3.15	Camundongos com transplante de medula óssea	40
3.16	Ensaio metabólicos.....	41
3.17	Quantificação de nitrito	41
3.18	Quantificação de lactato e citocinas	42

3.19	Ensaio de fagocitose	42
3.20	Análise estatística dos resultados	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Estudo 1: Efeito da inibição farmacológica do complexo 1 da mTOR no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associada à obesidade	43
4.1.1	<i>Efeito da inibição farmacológica dos complexos 1 e 2 da mTOR na polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2 in vitro</i>	<i>52</i>
4.2	Estudo 2: Efeito da superativação do complexo 1 da mTOR em macrófagos no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica	63
4.3	Efeito da superativação de mTORC1 na polarização de macrófagos derivados de células mielóides para os fenótipos M1 e M2 <i>in vitro</i>	71
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Obesidade é definida como o acúmulo excessivo de energia na forma de lipídeos no tecido adiposo e ectopicamente em outros órgãos como músculo e fígado (1), sendo o resultado de períodos prolongados de equilíbrio energético positivo determinado por ingestão calórica maior que gasto energético (2). Recentes estimativas da *World Health Organization* (WHO), cerca de 1,9 bilhões de adultos no mundo apresentam excesso de peso (Índice de Massa Corpórea [IMC] ≥ 25), sendo que destes, 600 milhões são obesos (IMC ≥ 30) (3). Segundo a WHO, indicam que aproximadamente 2,6 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao excesso de peso (4). No Brasil, a obesidade segue padrões similares de crescimento de países mais desenvolvidos. Ainda segundo a WHO, 55,6% dos brasileiros possuem excesso de peso, sendo destes 17,3% são considerados obesos. Esses números, que estão em franca expansão, representam o dobro da prevalência da obesidade observada em 1980 (3).

O crescimento exponencial do número de indivíduos portadores de obesidade tem como consequência principal o aumento da incidência de diversas doenças associadas ao excesso de gordura corporal como a hipertensão arterial, aterosclerose (5), doença hepática gordurosa não alcoólica (6), resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DT2), dislipidemia, síndrome metabólica (7, 8) e alguns tipos de câncer (mama, cólon, renal e endometrial) (9).

Especificamente em relação a resistência à insulina, a obesidade está associada com aproximadamente 90% dos casos diagnosticados de DT2 (10, 11) uma doença que, segundo estimativas, afeta cerca de 171 milhões de pessoas mundialmente (12). Em 2012, a DT2 foi a causa direta de 1,5 milhões de mortes (13). Apesar da relação clara e direta entre o excesso de adiposidade e o desenvolvimento da resistência à insulina, os mecanismos moleculares que conectam estas duas condições ainda não foram completamente elucidados. Evidências experimentais sugerem, entretanto, que o desenvolvimento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade associado à obesidade participa ativamente neste processo.

1.1.1 Inflamação crônica interliga obesidade e resistência à insulina

Estudos epidemiológicos encontraram uma forte correlação entre os níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios (fibrinogênio, IL-6, TNF- α , MCP-1, proteína C reativa, lipopolissacarídeos, dentre outros) e o desenvolvimento de resistência à insulina em indivíduos portadores de obesidade visceral, sugerindo a participação do sistema imune e processos inflamatórios como possíveis mediadores entre o excesso de peso e o DT2 (14, 15, 16). Corroborando esta hipótese, estudos em modelos animais de obesidade e resistência à insulina induzidos por dieta encontraram um aumento significativo na secreção pelos adipócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo de diversas adipocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL-1 β e IL-6 que possuem importante ação inibitória na sensibilidade à insulina em diversos tecidos centrais e periféricos (17, 18, 19, 20).

Além do tecido adiposo, macrófagos com fenótipos específicos podem ser encontrados em diversos outros tecidos corporais, como o sistema nervoso central em estreito contato com neurônios e astrócitos (microglia), no fígado (células de Kupffer), nos ossos (osteoclastos), na rede glomerular nos rins (células mesangiais), nos pulmões (macrófagos alveolares) e no baço, linfonodos e timo (apresentadores de antígenos) (21). Estudos demonstram também um aumento do número de macrófagos nas ilhotas de Langerhans de ratos obesos e pacientes com DT2 (22), que estão localizados principalmente ao redor das células endócrinas e apresentam perfil pró-inflamatório, como determinado pelo maior número de células CD68⁺ (23). Contudo, a participação destas células no controle da função endócrina pancreática ainda não foi completamente elucidada.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os fatores desencadeadores e mecanismos moleculares que promovem o processo inflamatório crônico de baixa intensidade encontrado na obesidade. Pesquisas recentes sugerem que os ácidos graxos livres, que até pouco tempo eram considerados unicamente como substratos metabólicos, participam ativamente no desenvolvimento do processo inflamatório associado à obesidade. No hipotálamo, músculo esquelético, tecido

adiposo e fígado, por exemplo, a ativação de receptores toll-like (TLR) por ácidos graxos saturados induz um aumento na expressão local de citocinas e outros sinais inflamatórios que promovem resistência à ação insulínica (24, 25, 26). Além de ativar os TLRs, ácidos graxos podem também alterar a composição lipídica das membranas celulares e de organelas, servirem como substratos para a síntese de mediadores lipídicos, e alterar a atividade de diversas vias de sinalização intracelular, efeitos estes que podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina (27, 28). Cronicamente, níveis circulantes elevados de ácido graxos livres estão geralmente associados com deposição ectópica de lipídeos em tecidos como o músculo esquelético (29, 30) e fígado (31, 32), e desenvolvimento da resistência à insulina nestes tecidos (33, 34).

Além dos ácidos graxos, os lipopolissacarídeos (LPS), componentes da parede de bactérias gram-negativas, podem estar envolvidos na gênese do processo inflamatório associado à obesidade. O LPS endógeno é produzido principalmente no intestino pela morte de bactérias que compõem a flora intestinal, absorvido juntamente com a gordura pelo sistema linfático (35) e transportado para os tecidos-alvos pelos quilomícrons recém-sintetizados por células epiteliais intestinais (36). Após interação com o complexo TLR4 e mCD14 na superfície de leucócitos (37, 38), adipócitos e hepatócitos, entre outras células, o LPS desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a ativação do fator de transcrição NFkB e a produção e secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias (39). Indivíduos portadores de obesidade apresentam níveis circulantes elevados de LPS, provavelmente devido a maior presença de bactérias gram-negativas e permeabilidade intestinal a esta endotoxina (40). Interessantemente, o tratamento de camundongos livres de patógenos (germ-free) com LPS promove o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina (39).

O tecido adiposo em condições de equilíbrio energético positivo e deposição excessiva de lipídeos é acometido por processo inflamatório de baixa intensidade caracterizado pelo aumento significativo do número de leucócitos (linfócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos) infiltrados. Especificamente em relação a macrófagos, estudos encontraram que estas células representam aproximadamente

50% das células que compõem o tecido adiposo em humanos portadores de obesidade (41, 42).

Além do número absoluto de macrófagos infiltrados no tecido adiposo, a obesidade também está associada a uma alteração do fenótipo destas células. Indivíduos magros saudáveis apresentam em seu tecido adiposo principalmente macrófagos ativados alternativamente com fenótipo M2 (43), que são induzidos em resposta à secreção de IL-4 e IL-13 por linfócitos T helper 2, produzem citocinas anti-inflamatórias incluindo a IL-10 e o antagonista do receptor IL-1 β (44) e participam na manutenção da homeostase tecidual. Na obesidade, entretanto, ocorre um aumento de linfócitos T helper 1 (45) que secretam interferon- γ (IFN- γ) entre outras citocinas pró-inflamatórias que induzem a polarização de macrófagos residentes no tecido adiposo para um fenótipo pró-inflamatório clássico M1. Além da secreção de IFN- γ por linfócitos T helper 1, o aumento de LPS e ácidos graxos circulantes e o acúmulo intracelular de acilgliceróis devido à inabilidade do tecido adiposo de tamponar o excesso de gordura, atuam também como desencadeadores deste processo (46). Diversos estudos indicam que tanto o aumento no número de macrófagos residentes no tecido adiposo quanto sua polarização para o fenótipo M1 são eventos importantes para a digestão de adipócitos mortos e remodelamento da matriz extracelular que ocorre durante expansão tecidual (44, 45). Por outro lado, o acúmulo de leucócitos pró-inflamatórios no tecido adiposo promove processo inflamatório local que induz resistência à insulina e disfunção dos adipócitos (45).

Mecanicamente várias proteínas quinases intracelulares incluindo a janus quinase (JNK), I κ B quinase β (IKK β), proteína quinase C (PKC) e p70 S6 quinase 1 (S6K1) parecem participar da resistência à insulina induzida por mediadores inflamatórios. Estas proteínas quinases inibem a ação da insulina através da fosforilação de resíduos de serina no substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), bloqueando sua fosforilação e ativação pelo receptor da insulina (17, 47). Além da fosforilação inibitória de IRS-1, a resistência à insulina também pode ocorrer como resultado de reduzida atividade de outras etapas subsequentes na via de sinalização intracelular deste hormônio, como a atividade ou fosforilação da PI3K a ativação da Akt e a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT 4) à membrana. Todas estas

etapas são passíveis de modulação por mediadores pró-inflamatórios.

1.2 mTOR

Em indivíduos portadores de obesidade, os diversos tecidos e células corporais são constantemente e cronicamente desafiados por concentrações elevadas de nutrientes, como glicose, ácidos graxos e aminoácidos. Dentre os diversos sensores de nutrientes intracelulares, a proteína alvo mecanístico da rapamicina (*mechanistic target of rapamycin*, mTOR), uma serina-treonina quinase que controla o crescimento, a diferenciação, a proliferação (48), e a sobrevivência celular (49), está superativada em condições de obesidade muito provavelmente devido à exposição ao excesso de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento (50, 51).

mTOR é o núcleo catalítico de dois complexos proteicos distintos denominados de complexo 1 (mTORC1) e 2 da mTOR (mTORC2) (52). Além da mTOR, mTORC1 é composto pela proteína reguladora associada a mTOR (raptor), a proteína 8 letal em mamíferos com Sec13 (mLST8), o substrato rico em prolina da Akt de 40 kDa (PRAS40) e a proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP (Deptor). Raptor regula a formação e a localização intracelular de mTORC1 (53, 54), sendo fundamental para a atividade deste complexo (55). Apesar de ser um componente de mTORC1 (48, 56), a função de mLST8 permanece incerta, pois sua deficiência não tem qualquer efeito sobre atividade mTORC1 *in vivo* ou *in vitro* (57). Em contraste, PRAS40 e Deptor são inibidores da atividade mTORC1 (58, 59, 60, 61, 62, 63).

Por outro lado, mTORC2 é composto pela mTOR, a proteína parceira de mTOR não sensível a rapamicina (Rictor), proteína de interação a proteína quinase ativada por estresse de mamíferos (mSIN1) e proteína observada com Rictor-1 (Protor-1, também conhecido como PRR5). Rictor é absolutamente necessário para a atividade catalítica de mTORC2 (64) auxiliando, juntamente com mSIN1, na estabilização estrutural do complexo (65, 66). Protor-1 interage com Rictor, mas não é necessário para a função catalítica de mTORC2 (60, 67), enquanto mLST8 é necessário para a atividade de mTORC2 *in vivo* e *in vitro* (57). Tal como acontece com mTORC1, Deptor também inibe mTORC2 (63) (Figura 1).

A insulina e outros fatores de crescimento como o IGF-1 são importantes reguladores positivos da atividade dos complexos 1 e 2 da mTOR. A interação da insulina com seu receptor na superfície celular promove a atividade tirosina quinase intrínseca do mesmo resultando em autofosforilação do seu domínio intracelular e o recrutamento, fosforilação e ativação do IRS-1. Após ativação, IRS-1 interage e ativa a PI3K que catalisa a conversão de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) (66). O acúmulo de PIP3 promove o recrutamento e a ativação de Akt através da fosforilação do resíduo de treonina 308 catalisada pela proteína quinase dependente de fosfoinositol (PDK1) e em serina 473 catalisada pela mTORC2. Após ativação, a Akt fosforila e inibe o heterodímero TSC1/TSC2 e sua atividade GTPase intrínseca, desta forma aumentando os níveis da proteína Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) associado ao GTP, um ativador alostérico de mTORC1 (68, 69, 70, 71).

Além da insulina, a atividade de mTORC1 é ativada por aminoácidos de cadeia ramificada como a leucina, isoleucina e valina em um processo mediado por proteínas denominadas de Rags que catalisam a translocação do complexo para os lisossomos (72).

Current Opinion in Cell Biology

Figura 1 - mTOR forma dois complexos estruturalmente e funcionalmente distintos, que regulam o metabolismo e crescimento. Aminoácidos (roxo) regulam positivamente o mTORC1 pela ativação das proteínas Rags GTPases. Os fatores de crescimento (verde) regulam positivamente mTORC1 pela ativação via PI3K-Akt-TSC1. Os fatores de crescimento também regulam positivamente mTORC2 pelo aumento na formação de PIP3 via PI3K. Estado de baixa energia (amarelo) regula negativamente mTORC1 via AMPK. Substratos dos complexos de mTOR estão representados em cinza. Figura modificada de (73).

1.2.1 Funções biológicas dos complexos 1 e 2 da mTOR

O mTORC1 desempenha papel fundamental no controle do crescimento e proliferação celular promovendo, de acordo com a disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento, processos anabólicos como a síntese de proteínas e lipídeos e

inibindo processos catabólicos como autofagia (74). mTORC1 regula positivamente a síntese proteica através da fosforilação da proteína de ligação com o fator eucariótico de iniciação 4E (4E-BP1) e a proteína p70-ribossomal S6 quinase (S6K) (75, 76). A fosforilação de 4E-BP reduz o efeito inibitório desta proteína sobre o fator eucariótico de iniciação 4E (eIF4E) que participa na formação do complexo ribossomal promovendo a tradução dependente de cap (77). Já a fosforilação de S6K promove a biogênese de mRNA e fosforilação de diversas proteínas ribossomais como a S6 e a quinase do fator eucariótico de alongação (78).

Além da síntese proteica, a ativação de mTORC1 promove a lipogênese por dois mecanismos distintos que envolvem os fatores de transcrição proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides (SREBPs, sterol regulatory element-binding proteins) e o receptor ativador da proliferação peroxissomal (PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor) (79). A ativação do mTORC1 induz a clivagem e ativação de SREBP-1c que se transloca para o núcleo promovendo a transcrição de genes envolvidos na síntese do colesterol, ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolipídeos. mTORC1 promove também aumento na atividade transcricional de PPAR- γ que estimula a expressão de diversos genes envolvidos na captação de ácidos graxos e esterificação em triacilglicerol em adipócitos (78).

Além de promover processos anabólicos, mTORC1 possui ação inibitória sobre processos catabólicos como a autofagia, que é definida como o sequestro de componentes intracelulares em autofagossomas e subsequente degradação pelos lisossomos. A ativação de mTORC1 está associada à inibição da autofagia por um mecanismo que requer a fosforilação e consequente inibição de ATG13 e ULK1 (80, 81, 56).

Evidências suportam o envolvimento de mTORC1 no controle da sensibilidade à insulina. Além de ativar a proteína ribossomal S6, o substrato de mTORC1, S6K1 realiza retroalimentação (feedback) negativa inibindo a sinalização intracelular da insulina através da fosforilação de sítios inibitórios (Ser 636/639 e 1101) de IRS-1. Neste sentido, a inibição de mTORC1 pela rapamicina *in vitro* resulta em aumento na fosforilação de IRS-1 em resíduos de tirosina aumentando a sensibilidade à insulina (82).

Similarmente a mTORC1, a completa caracterização dos processos celulares regulados por mTORC2 ainda não foi totalmente finalizada. Os substratos principais do complexo 2 da mTOR são as proteínas quinases SGK (quinase regulada por soro e glicocorticóides), PKCa e Akt. Entre as principais ações do mTORC2 estão a formação do citoesqueleto de actina em resposta a sinais mitogênicos que ocorre através da fosforilação e ativação de PKCa, um membro da família AGC de serina-treonina quinases (83, 64). mTORC2 estimula também, através da fosforilação e ativação de Akt, a captação de glicose catalisada pelo transportador de glicose 4 (GLUT4), a proliferação e a sobrevivência celular e inibe a apoptose, sendo a ativação crônica e aberrante de mTORC2 frequentemente associada com certos tipos de câncer (84). Neste sentido, a inibição de mTORC2 pode ser uma ferramenta interessante no tratamento de tumores caracterizados por superativação da Akt (85).

1.2.2 Inibidores farmacológicos de mTOR

A atividade do mTORC1 pode ser inibida farmacologicamente pela rapamicina (ou sirolimus®, LC laboratories, Woburn, MA, United States), um macrolídeo encontrado na bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que foi identificado inicialmente como agente anti-fúngico em 1975 (86). A rapamicina inibe parcialmente mTORC1 através da formação de um complexo com a proteína FKBP12 (FK506 de 12kDa) que interage com o domínio FRB de mTOR dissociando Raptor (54, 87). Em contraste a mTORC1, o complexo rapamicina-FKBP12 não interage diretamente com mTOR associada ao complexo 2. Entretanto, a rapamicina pode inibir mTORC2 em alguns tipos celulares e após período prolongado de tratamento por mecanismo que parece envolver o sequestro de mTOR livre reduzindo sua disponibilidade para a formação deste complexo (88). Atualmente, a rapamicina é utilizada clinicamente como droga imunossupressora para a prevenção da rejeição de órgãos em pacientes transplantados, devido a inibição de mTORC1 e da expansão clonal de linfócitos (89).

Recentemente, uma droga mais potente que a rapamicina e com atividade inibitória para ambos os complexos 1 e 2 da mTOR foi desenvolvida. Esta droga denominada torina inibe ambos mTORC1 e 2 através da competição com o ATP pela

ocupação do sítio catalítico da quinase mTOR, impedindo assim a retirada de grupamentos fosfatos desta molécula para a fosforilação de proteínas (90).

1.2.3 mTOR e sistema imune

Diversos progressos foram obtidos recentemente no estudo do envolvimento dos mTORC1 e mTORC2 no controle de respostas imunológicas inatas e adaptativas (91). Já está bem estabelecido que em diferentes tipos de leucócitos como macrófagos e linfócitos, por exemplo, a ativação de receptores de antígenos (receptores de células T e B), de receptores de citocinas (receptor da IL-2, entre outros) e dos TLR está associada com um aumento da atividade de mTORC1 e mTORC2, um efeito que parece ser mediado pela ativação de PI3K (92, 93). Especificamente em linfócitos, a ativação de mTORC1 parece ser crucial para a migração adequada dos linfócitos T CD8+, para o crescimento e proliferação de células CD4+, bem como, para a diferenciação dos diferentes subtipos de células T helper através do controle da expressão do fator de transcrição FOXP3 (forkhead Box P3) (94). Estudos indicam que linfócitos com deficiência de mTORC1 não se diferenciam para os fenótipos Th1, Th2 ou Th17 (94).

Além de linfócitos, mTOR parece ter um papel importante no controle da resposta pró-inflamatória de macrófagos e células dendríticas mielóides (95). Estudos *in vivo*, por exemplo, encontraram que a inibição farmacológica da mTOR com rapamicina protege e aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com dose letal de *Listeria monocytogenes*. (95). Foi demonstrado também que a inibição farmacológica de mTOR com rapamicina está associada ao aumento da secreção *in vitro* de IL-12p40, IL-12p70, IL-23, TNF- α e IL-6 e redução da secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 por células dendríticas e macrófagos (96, 95). É importante ressaltar que a ativação constitutiva de mTORC1 pela deleção de seu inibidor endógeno TSC2 atenua a resposta pró-inflamatória de macrófagos induzida pelo tratamento com LPS (95).

Similarmente a inibição mTORC1, a deleção genética em células mielóides de Rictor, um componente essencial de mTORC2, exacerba a resposta pró-inflamatória de macrófagos derivados da medula óssea induzida pelo tratamento com LPS como

evidenciado pela elevada secreção de proteínas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 por estas células (97). Esta similaridade de fenótipos apresentados pela inibição de mTORC1 e 2 em resposta ao LPS sugere uma inter-relação entre os dois complexos no controle da função de macrófagos, hipótese esta que precisa ser melhor investigada.

Analizados em conjunto, os estudos acima descritos sugerem que a inibição de mTOR está associada com uma supressão da ativação de células T efectoras, processo este que ocorre simultaneamente a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células dendríticas.

1.2.4 mTOR e resistência à insulina

Como descrito anteriormente, a ativação crônica da via mTORC1/S6K1 por nutrientes, insulina ou citocinas promove resistência à insulina por um mecanismo de retroalimentação negativa, onde o substrato de mTORC1 S6K1, quando ativo, fosforila resíduos de serina do IRS-1 bloqueando a sua ativação e consequentemente a da via da PI3K/Akt pela insulina (98, 99, 82). Desta forma, a inibição aguda de mTORC1/S6K1 com rapamicina restabelece a habilidade da insulina de ativar a via da PI3K/Akt e previne à resistência a insulina induzida pelo excesso de nutrientes e citocinas em células musculares e adiposas (98, 99, 100, 82). Corroborando com esses achados, camundongos induzidos obesos e resistentes à insulina pela ingestão de dieta rica em gordura apresentam superativação do mTORC1/S6K1 no fígado e no músculo esquelético associada a um aumento da fosforilação inibitória do IRS-1 em resíduos de serina (50). Além disso, a fosforilação do IRS-1 em serina 1101 é aumentada no fígado de camundongos obesos *db/db* e selvagens, mas não em animais deficientes em S6K1 mantidos em dieta rica em gordura. Estes resultados sugerem fortemente que a fosforilação do IRS-1 em serina por S6K1 é um elemento causal importante no desenvolvimento da resistência à insulina em animais em condições de excesso de nutrientes, inflamação e obesidade. Os achados de que a resistência à insulina induzida pela ativação crônica mTORC1/S6K1 é uma característica molecular comum encontrada na obesidade (50, 101) motivaram vários estudos que investigaram o papel potencial da rapamicina como agente de sensibilização à insulina *in vivo* (102).

Surpreendentemente, apesar de inibir a retroalimentação negativa exercida pela S6K1 na função de IRS-1, o tratamento prolongado com rapamicina *in vivo* induz uma severa intolerância à glicose e resistência à insulina em roedores, como evidenciado pelo aumento da gliconeogênese hepática (102) e reduzida captação de glicose pelo músculo esquelético (103). Subsequentemente a estes estudos, Lamming e colaboradores (2012) (104) apresentaram diversas evidências indicando que a intolerância à glicose e resistência à insulina induzidas pelo tratamento com rapamicina são em parte mediadas pela inibição de mTORC2 e assim da fosforilação de Akt por este macrolídeo (104). Ainda neste estudo, foi sugerido que a rapamicina inibe mTORC2 através do sequestro de mTOR impedindo assim a formação deste complexo, hipótese esta que ainda não recebeu confirmação experimental. Na verdade, em um estudo recente publicado pelo nosso grupo, demonstramos que o tratamento com rosiglitazona, um agonista de PPAR- γ que possui ações anti-inflamatórias, restabelece a habilidade da insulina de inibir a gliconeogênese hepática e promover a captação de glicose no músculo esquelético de ratos tratados com rapamicina, efeitos estes que não foram associados com alterações no conteúdo de Akt fosforilada em serina 473. Estes dados indicam que processos diferentes do sequestro de mTOR e inibição de mTORC2 estão envolvidos na intolerância à glicose e resistência à insulina induzida pelo tratamento com rapamicina (105). Neste sentido, nós propusemos a hipótese de que a intolerância à glicose induzida pela rapamicina *in vivo* ocorre, pelo menos em parte, devido ao desenvolvimento de processo pró-inflamatório nos tecidos periféricos induzido pela inibição de mTOR. Para testar esta hipótese, em um primeiro estudo, camundongos alimentados com dieta HF que apresentam atividade de mTORC1 aumentada nos tecidos periféricos foram tratados ou não com rapamicina e avaliados para diversos parâmetros metabólicos e inflamatórios. Como os macrófagos desempenham função importante no desenvolvimento do processo inflamatório associado à obesidade, em um segundo estudo, nós investigamos o envolvimento de mTOR como mediador da polarização, metabolismo e função destas células.

Em um segundo estudo, com o objetivo de melhor caracterizar o envolvimento de mTORC1 no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associado à obesidade, nós produzimos camundongos com ativação constitutiva de mTORC1

exclusivamente em células mielóides pela deleção de TSC1 via sistema Cre-Lox, camundongos estes que foram desafiados com dieta HF por 8 semanas e avaliados para diversos parâmetros metabólicos e inflamatórios. Finalmente, o efeito da ativação constitutiva de mTORC1 na polarização de células mielóides para macrófagos *in vitro* também foi investigado.

2 OBJETIVOS

Investigar o envolvimento do complexo 1 da mTOR no controle da homeostase da glicose e desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associado a obesidade e dos complexos 1 e 2 da mTOR no controle da polarização e função de macrófagos *in vitro*.

2.1 Os objetivos específicos investigados foram

1) Investigar os efeitos da inibição farmacológica do complexo 1 da mTOR com rapamicina na homeostase da glicose e inflamação do tecido adiposo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD);

2) Investigar os efeitos da inibição farmacológica de mTORC1 e 2 com rapamicina ou torina na diferenciação de células mielóides em macrófagos, polarização *in vitro* para os fenótipos M1 e M2, metabolismo da glicose, ácidos graxos, atividade secretória e fagocítica;

3) Investigar os efeitos da superativação de mTORC1 específica em células mielóides no desenvolvimento da obesidade, intolerância a glicose e inflamação do tecido adiposo induzida por dieta HF;

4) Investigar os efeitos da superativação de mTORC1 na diferenciação de células mielóides em macrófagos e polarização *in vitro* para os fenótipos M1 e M2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

No presente trabalho foram usados camundongos C57BL6 e camundongos com deleção genética de TSC1 especificamente em células mielóides. Para a produção dos camundongos com deleção tecido específica de TSC1, foram adquiridos da empresa JAX Mice (*The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA*) os camundongos Tsc1Lox/Lox (Tsc1tm1Djk/J) e camundongos que expressam a enzima Cre recombinase controlada pelo promotor de lisozima M (B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J). Dessa forma, somente em células específicas que expressam a lisozima M, como células mielóides, granulócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos maduros, pode ocorrer a deleção de TSC1 (e consequentemente a superativação de mTORC1). Após duas rodadas de cruzamento foram selecionados, camundongos homozigotos para TSC1 floxeado e positivos para a enzima Cre recombinase (MaTSC1KO) e camundongos homozigotos para TSC1 floxeado e negativos para a enzima Cre recombinase (MaTSC1WT).

Os animais C57BL6 foram alimentados com dieta hiperlipídica (HF) e receberam por gavagem solução de carboximetilcelulose (0,2%) contendo ou não rapamicina (2 mg/ kg/ dia) durante 30 dias. Já os animais MaTSC1KO e MaTSC1WT foram induzidos obesos pela ingestão de dieta HF por 8 semanas. A composição de macronutrientes das dietas utilizadas está detalhada abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de macronutrientes das dietas controle e hiperlipídica.

	Dieta	Dieta
	Controle	hiperlipídica
Carboidratos	70%	20%
Lipídios	10%	60%
Proteínas	20%	20%
Kcal/kg de dieta	3836	5231

3.2 Genotipagem

Camundongos tiveram aproximadamente 0,2 cm de sua cauda cortada após anestesia com isoflurano. A extração do DNA caudal foi realizado por digestão com NaOH (50 mM) por 12 minutos a 95 °C, seguido de neutralização com Tris-HCL (1M, pH 6,8) e centrifugação por 15 min à 13000 rpm. O sobrenadante desta solução foi utilizado para PCR com kit Platinum TAQ DNA polimerase (*Invitrogen*). Os primers utilizados para genotipagem do TSC1LOX/LOX foram: GTCACGACCGTAGCACAACC e GAATCAACCCACAG. Já os primers utilizados para genotipagem da Lisozima CRE foram: CCCAGAAATGCCAGATTACG, CTTGCCCTGCCACAA e TTACAGTCGGCCACGCTGAC. As amostras foram corridas em gel de agarose 1,5% para a separação dos produtos de PCR segundo o padrão descrito abaixo:

- Homozigoto TSC floxeado: uma banda única de 230 pares de base.
- Heterozigoto TSC floxeado: duas bandas de 193 e 230 pares de base.

Dentre os camundongos TSC flox homozigotos, houve a classificação em positivos ou negativos para a CRE recombinase sob o controle do promotor da Lisozima M:

- CRE recombinase positivo: banda de 225 e 350 pares de base.

- CRE recombinase negativo: banda de 350 pares de base.

A Figura 2 ilustra um exemplo de gel de agarose de genotipagem para TSC lox e CRE recombinase.

Figura 2 - Imagem ilustrativa de gel de agarose usado para a genotipagem. (A) classificação entre heterozigotos e homozigotos, (B) classificação em positivos ou negativos para a CRE recombinase.

3.3 Teste de tolerância a glicose (GTT) e área sob a curva

Camundongos privados de alimentos por 6 horas foram injetados intraperitonealmente com solução de glicose (1g/kg). O sangue da cauda foi coletado e a glicemia foi determinada antes (tempo 0) e 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção de glicose com o auxílio de glicosímetro (*OneTouch Johnson & Johnson*). A área sob a curva foi calculada utilizando o programa Graph Prism 6.

3.4 Teste de tolerância a insulina (ITT) e kITT

Camundongos privados de alimentos por 6 horas foram injetados intraperitonealmente com insulina regular humana (0,75 U/kg) e as concentrações plasmáticas de glicose foram medidas antes (tempo 0), 15 e 30 minutos após a injeção de insulina com o auxílio de glicosímetro (*OneTouch Johnson & Johnson*). O kITT foi

calculado como a velocidade de decaimento da glicemia após injeção de insulina (%/min).

3.5 Peso dos animais, consumo alimentar e eficiência energética

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram medidos semanalmente em balança semi-analítica. A eficiência energética foi calculada através do ganho de peso dividido pelo consumo alimentar multiplicado por 100.

3.6 Calorimetria indireta

Camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO foram acondicionados nas caixas durante 2 dias consecutivos para adaptação. Em seguida, a medida do consumo de oxigênio (VO_2), produção de dióxido de carbono (VCO_2) e atividade motora espontânea foi realizada utilizando o Sistema de Monitoramento Global de Laboratório (*Columbus Instruments*), um calorímetro de circuito aberto integrado equipado com um sistema óptico de monitoramento de atividade motora por feixe. O quociente respiratório foi calculado como a razão VCO_2 / VO_2 .

3.7 Eutanásia

Após o período de protocolo experimental (30 dias ou 8 semanas), os animais foram privados de alimento por 12 horas e eutanasiados. Foi coletado sangue, e posteriormente, foi realizada a laparotomia mediana para remoção dos tecidos adiposos inguinal, epididimal, retroperitoneal, marrom, fígado e baço. Os tecidos foram pesados e processados para as análises específicas ou congelados em nitrogênio líquido.

3.8 Células imunes residentes no tecido adiposo

As células imunes residentes no tecido adiposo foram isoladas através de digestão do tecido adiposo epididimal com collagenase. Para isso, o tecido adiposo

epididimal foi picado em pequenos fragmentos e incubados em 4 mL de tampão DMEM contendo HEPES 20 mM, albumina bovina sérica (BSA) 4%, collagenase II (*Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos*) 1,0 mg/mL, pH 7,4 por cerca de 45 minutos a 37 °C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e acrescida de 25 mL de tampão contendo sais de EARLE/HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, pH 7,45 e mantido a 37 °C. Os adipócitos que emergiram a superfície do tampão foram retirados e a fração estroma-vascular foi isolada por centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. O pellet de células formado que contém leucócitos, células endoteliais, pré-adipócitos entre outras, foi re-suspenso em tampão de lise de hemácias, submetidos a centrifugação por 10 min a 1500 rpm, filtrados em filtro 70 µm, novamente re-suspenso em PBS contendo 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e destinado a marcação e análise por FACs como descrito abaixo.

3.9 Marcação celular para o citômetro de fluxo (FACS)

Células da fração estroma-vascular ou macrófagos diferenciados *in vitro* foram transferidos para placa de 96 wells e centrifugados para a retirada do sobrenadante. Células foram re-suspensas em *Fc block*, incubadas por 10 minutos à 4 °C, e acrescidas de mistura de anticorpos (Tabela 2) seguida de incubação por 30 min à 4 °C. Em seguida as amostras foram novamente lavadas com PBS 2% SFB, fixadas com tampão BD *Cytofix* e incubadas por 20 minutos à 4 °C. As células foram lavadas e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo Canto II. O programa utilizado para aquisição de dados no BD canto II foi o Diva-SoftwareTM. Foram adquiridos 50000 eventos por amostra e para a análise foi usado o software Flowjo 10.0.7.

Tabela 2 - Lista de anticorpos de superfície usada na marcação de células nos experimentos de citometria de fluxo.

	Tipo celular	anticorpo	fluorocromo	experimento
MIX1	Macrófago	CD11b	PB	<i>In vivo e in vitro</i>
	Macrófago	F4/80	PE	<i>In vivo e vitro</i>
	M2	CD206	FITC	<i>In vivo e in vitro</i>
	M1	CD86	APC	<i>In vivo e in vitro</i>
MIX2	Linfócito T	CD3	FITC	<i>In vivo</i>
	Linfócito T helper	CD4	APC CY7	<i>In vivo</i>
	Linfócito T citotoxico	CD8	Perc P Cy 5.5	<i>In vivo</i>
	Ativação de linfócito T	CD 69	APC	<i>In vivo</i>
	Ativação de linfócito T	CD25	PE Cy7	<i>In vivo</i>
MIX3	Neutrófilo	Ly6G	PE	<i>In vivo</i>
	Célula dendrítica	CD11c	PB	<i>In vivo</i>
	Ativação de célula dendrítica	CD86	APC	<i>In vivo</i>
	Linfócito B	CD19	FITC	<i>In vivo</i>
Macrófago	compensador	CD11b	PB	<i>In vitro</i>
Macrófago	compensador	CD11b	FITC	<i>In vitro</i>
Macrófago	compensador	F4/80	PE	<i>In vitro</i>
Macrófago	compensador	CD11b	APC	<i>In vitro</i>
Linfonodo	compensador	CD3	FITC	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD4	APC Cy7	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD8	PercP Cy 5.5	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD8	APC	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD4	PE Cy7	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD4	PB	<i>In vivo</i>
Linfonodo	compensador	CD4	PE	<i>In vivo</i>

3.10 Imunofenotipagem

Como detalhado na Tabela 2, foram considerados macrófagos as células que apresentaram dupla marcação para CD11b⁺ e F4/80⁺ na superfície. Dentro desta

população de macrófagos, as células que expressavam CD206⁺ e CD86⁻ foram consideradas como de fenótipo M2 e as que expressavam CD86⁺ e CD206⁻ como M1. Células que expressavam CD11c⁺ foram consideradas como células dendríticas, sendo que dentro desta população, células positivas para CD86 foram consideradas como dendríticas ativadas. Células que expressam CD3⁺ foram consideradas como linfócitos T que foram sub-classificados como linfócito T helper (CD4⁺ e CD8⁻) e citotóxico (CD8⁺ e CD4⁻). Dentro das populações de CD4⁺ e CD8⁺ ainda foram analisadas as células ativadas com a dupla marcação de CD69⁺ e CD25⁺. Células positivas para Ly6G⁺ foram classificadas como neutrófilos e células positivas para CD19⁺ foram considerados linfócitos B.

3.11 Macrófagos derivados da medula óssea e polarização

Camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e limpos com álcool 70% em abundância. Tíbias e fêmures inteiros dos camundongos foram retirados e mergulhados em PBS. No fluxo laminar, os ossos foram mergulhados no etanol 70% por 4 minutos e transferidos para o PBS estéril em placas de petri. Com o material cirúrgico embebido no álcool, as extremidades dos ossos foram cortadas e com a ajuda de seringa e agulha, os ossos foram lavados internamente com PBS. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C, as células foram re-suspensas em solução hipotônica para a lise das hemácias e centrifugadas novamente a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram re-suspensas em meio completo (30% sobrenadante de cultura de célula L929, 15% SFB e 1% antibiótico penicilina/estreptomicina em DMEM HIGH). Toda solução celular foi filtrada e plaqueada 0,5 x 10⁶ cél/poço em placas de 6 poços. No terceiro dia, o meio foi trocado após lavagem com PBS morno. Após 6 dias, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS morno e incubadas por 30 minutos com DMSO, rapamicina ou torina. Após esse período, células foram incubadas por 24 h com meio de diferenciação contendo LPS (50ng/mL) e IFN-γ (5ng/mL) para induzir polarização para macrófagos M1, e IL-4 (10ng/mL) e IL-13 (10ng/mL) para induzir diferenciação para macrófagos M2.

Para a obtenção do meio de células L929, 20 mL de meio DMEM 10% SFB foi

adicionado a células L929 com 60% de confluência. Após 7 dias, este meio foi retirado, centrifugado, filtrado e armazenado para posterior uso. As células L929 são excelentes produtoras de M-CSF que é essencial para a proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos.

3.12 Análise da expressão gênica por PCR

Amostras de 50 mg de tecido adiposo epididimal foram homogeneizadas em homogeneizador UltraTurrax por 30 segundos com 0,5 mL de Trizol Reagent (*Invitrogen, Life Technologies, USA*). Na etapa de extração foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio seguido de agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos, com posterior centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase superior aquosa foi transferida para outro tubo e adicionada de 0,7 mL de álcool etílico 70 %. Essa mistura foi transferida para uma coluna de purificação de RNA seguindo o protocolo do fabricante (*RNA Minispin GE Healthcare*). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*) a 260 nm. Para a análise da pureza do RNA, adotou-se o cálculo da razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm, aceitando-se valores entre 1,8 e 2.

Alíquotas de 12 µL de amostras contendo 1 µg de RNA total foram utilizadas para a síntese de cDNA. A esse volume, foi adicionado 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL de oligoDT 50 µM, seguido de incubação a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 6 µL da mistura contendo 5X *first strand buffer*, DTT 0,1 M e Superscript transcriptase reversa 200 U/µL na relação 4:1:1. Seguiu-se com a incubação a 50 °C por 1 hora, seguido de 70 °C por 15 minutos e 4 °C por 3 minutos. Ao término desse processo, 18 µL de cada amostra foram coletados e adicionados em 432 µL de água livre de RNase. Foram feitas 5 alíquotas de cada amostra que foram armazenadas à 80 °C.

3.13 PCR quantitativo

O PCR quantitativo foi realizado com 3 µL de cDNA, 2,74 µL de água, 3,93 µL de

SYBR Green (*Sigma-Aldrich*) e 0,33 μL de primer a 5 μM . Essa mistura foi incubada em PCR RotorGene (*Qiagen*) por 40 ciclos. A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de C_T comparativo. A expressão do gene alvo foi normalizada pelo controlador endógeno. Para cada gene alvo foram calculados os valores de ΔC_T . Em seguida foi calculado o conteúdo relativo de RNAm ($2^{-\Delta C_T}$). O valor obtido foi normalizado pelo gene de controle endógeno.

Os *primers* foram desenhados e utilizados para os RNAm que codificam as seguintes proteínas: F4/80, CD11b, CD86, TNF- α , iNOS, MCP-1 CD206 (MRC1), MGL2, CLEC10a, NLRP3, ASC PyCARD, DUSP 6, CASPASE1, IL-1 β , IL-10, IL-18 e ARGINASE 1. Como gene normalizador, foi utilizado 36B4. As sequências dos primers usados estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequências dos primers sense e antisense utilizados no qPCR.

	Primer sense	Primer antisense
36B4	CCACTTACTGAAAAGGTCAAGGC	TGGTTGCTTTGGCGGGATTA
F4/80	GCCACGGGGCTATGGGATGC	TCCCGTACCTGACGGTTGAGCA
CD11b (ITGAM)	GGCAGGAGTCGTATGTGAGG	AGCCAAGCTTGTATAGGCCA
CD86	CCCAGCAACACAGCCTCTAA	ACTCTGCATTTGGTTTTGCTGA
TNF- α	AGCCACGTCGTAGCAAACCA	GCAGGGGCTCTTGACGGCAG
IL-6	CCTCTCTGCAAGAGACTTCCATCCA	TCTCTGAAGGACTCTGGCTTTGTCT
iNOS	AAGTCCAGCCGCACCACCCT	TCCGTGGCAAAGCGAGCCAG
MCP-1	TCAGCCAGATGCAGTTAACGCCC	AGGCATCACAGTCCGAGTCACA
CD206 (MRC1)	ATGCCTTCGAATGGGTGCC	GAGGGATCGCCTGTTTTCCA
MGL2	ACAAAGGTTTCAAGAATTGGAGGC	AATGCCTCTGGCAGACATCG
CLEC10a	ACTCCCTGGAGGAGCAGAAT	GGGCCCAGTTCTTAAAGCCT
NLRP3	GGCAACAATGATCTTGGCGA	TTCACCCAAGTGTAGGCTCT
ASCPyCARD	GCCAGAACAGGACACTTTGTG	ACACTGCCATGCAAAGCATC
DUSP6	CGTTCTACCTGGAAGGTGGC	CTGCACGAGCCGTCTAGATT
CASPASE1	TGCCGTGGAGAGAAACAAGG	GGGCCTTCTTAATGCCATCATC
IL-1 β	CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA	CTGAGCGACCTGTCTTGGCCG
IL-10	TTCCCAGTCGGCCAGAGCCA	GGGAGAAATCGATGACAGCGCC
IL-18	GATCAAAGTGCCAGTGAACCC	GGTCACAGCCAGTCCTCTTAC
ARGINASE1	ACAAGACAGGGCTCCTTTCAG	GGCTTATGGTTACCCTCCCG

3.14 Western blotting

O tecido adiposo retroperitoneal ou macrófagos diferenciados foram

homogeneizados em tampão (50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1,5 mM NaVO₄, 50 mM NaF, 10 mM NaPirofosfato, 10 mM Beta-glicerofosfato de sódio, 1% Triton 100X e inibidores de protease) e posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a 4°C. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método do ácido bicinconínico (*BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*), e alíquotas contendo 30 µg de proteínas foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis NuPAGE® Bis-Tris 4-12% (Invitrogen). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de fluoreto de polivinilidene (PVDF). Após uma hora de bloqueio em leite livre de gordura a 5%, as membranas foram incubadas overnight com anticorpos primários específicos para proteínas envolvidas na via de mTOR: Akt total (#9685s) e fosforilada (Ser473; #4060), NFκB total (#3987) e fosforilada p65 (S536; #3033s), S6 total (#2217L) e fosforilada (Ser235/236; #5364s) e 4E-BP total (#9452) e fosforilada (Thr37/46; #2855s) (*Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA*) diluídos 1:1000 em leite 5%. Após lavagem e incubação com anticorpo secundário (1:5000), as proteínas foram reveladas foi obtida por quimioluminescência utilizando um kit *ECL Western blotting Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido)*. A luminescência gerada foi detectada por filme radiográfico.

3.15 Camundongos com transplante de medula óssea

As células da medula óssea de camundongos MaTSC1KO e MaTSC1WT foram retiradas conforme descrito acima e enxertadas em animais receptores TSC^{Lox/Lox} previamente irradiados em corpo inteiro a 1100cGy, divididos em duas doses com 1 hora de intervalo entre elas. Após 4 horas da irradiação, os animais receberam enxerto de 5.10⁶ células por via intravenosa pelo plexo intraocular. O grupo de camundongos controles (que não recebeu enxerto após irradiação) não sobreviveu por período superior a 4 dias. Os camundongos irradiados foram mantidos em caixas autoclavadas e em ambiente estéril por 2 semanas. Após este período, os animais foram alimentados com dieta HF.

3.16 Ensaios metabólicos

A incorporação de glicose em triacilglicerol (TAG), ácido graxo de TAG (TAG-ácido graxo), glicerol de TAG (TAG-glicerol) e sua conversão em CO_2 (oxidação) e a incorporação de ácido palmítico em TAG e sua oxidação foram estimadas em macrófagos derivados da medula óssea. Após 24 horas de incubação com DMSO, rapamicina ou torina, e polarizados para M1 e M2, macrófagos derivados da medula óssea aderidas em placas de 6 poços foram lavadas com tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato (pH 7,4) suplementado com 2% BSA, 5 mM glicose, 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]glicose (*New England Radiochemicals*) ou suplementado com 2% BSA, 5 mM glicose, 100 μM ácido palmítico e 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C] ácido palmítico (*New England Radiochemicals*) para os ensaios de incorporação de ácido palmítico. A reação foi interrompida com H_2SO_4 e o CO_2 foi capturado durante 20 minutos em pedaço de papel filtro umedecido com etanol:feniletilamina (1:1), o qual foi posteriormente destinado para contagem de radioatividade (106). Para a extração lipídica, as células foram lavadas com PBS, e suspensas em 250 μL de PBS e transferidas para eppendorf. No tubo foram adicionados 1500 μL de clorofórmio metanol (2:1) e 300 μL de água seguido de agitação em vórtex por 30 segundos, e centrifugação à 3000 rpm por 5 minutos. A parte superior da solução foi coletada para quantificação de proteína enquanto que, da fase inferior, 1 mL foi transferido para tubo de cintilação, onde após secagem completa, foi adicionado 2 mL de líquido de cintilação e destinado para contagem de radioatividade.

3.17 Quantificação de nitrito

A quantificação de nitrito, um derivado do óxido nítrico, foi realizada a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula óssea, após tratamento com DMSO, rapamicina e torina de macrófagos M0, M1 e M2. Para o ensaio, 100 μL do reagente de Griess (1% sulfanilamida em 5% H_3PO_4 e 0,1% α -naftil etilenodiamina em água destilada, na proporção 1:1) foram adicionados em 100 μL de amostra. Para a curva padrão, foram utilizadas concentrações entre 0 a 20 μM de nitrito de sódio (0,1mM), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (*Synergy HT Multi-Mode*

Microplate Reader) a 550 nm. Os resultados estão expressos como produção de nitrito (μM). O nitrito presente nas amostras reage com a sulfanilamida formando sal de diazônio, que é convertido em um composto de coloração rosada após a adição do α -naftil etilenodiamina.

3.18 Quantificação de lactato e citocinas

A quantificação do lactato e das citocinas produzidas pelos macrófagos diferenciados da medula óssea foram medidos do sobrenadante das culturas celulares. Após 24 horas de incubação com os tratamentos (DMSO, rapamicina e torina) e diferenciação para M1 e M2, o sobrenadante foi retirado armazenado para posterior análise. O lactato foi determinado por método enzimático pelo kit Lactato Enzimático (*Labtest*). Já as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 foram determinadas por ELISA usando kits comerciais específicos para camundongo (*DuoSet da R&D System, Minneapolis, MN, USA*).

3.19 Ensaio de fagocitose

O ensaio de fagocitose foi feito pela incubação de 100000 células em placa de 96 poços. Após o tratamento de macrófagos M0, M1 e M2 com DMSO, rapamicina e torina, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas e incubadas com pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles® Conjugate a 0,5 mg/ml por 2 horas. Após esse período foi feita a leitura de fluorescência com emissão de 585 e excitação de 560.

3.20 Análise estatística dos resultados

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas por análise de variância (ANOVA) One-Way ou Two-Way, seguido do pós-teste de Bonferroni. O programa Prisma 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização das análises estatísticas. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo 1: Efeito da inibição farmacológica do complexo 1 da mTOR no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associada à obesidade

Com o objetivo de investigar o envolvimento do complexo 1 da mTOR no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associado à obesidade, camundongos C57BL6 alimentados com dieta HFD foram tratados com veículo (carboximetilcelulose mais DMSO) ou rapamicina (2 mg/ kg/ dia, por gavagem) por 30 dias.

Como esperado, a ingestão de dieta HF induziu um aumento significativo no conteúdo proteico de pS6 e p4-EBP, e reduziu o conteúdo de pAkt Ser473 no tecido adiposo. O tratamento com rapamicina, entretanto, reduziu significativamente o conteúdo proteico de pS6 e bloqueou a redução de pAkt S473 induzido pela dieta HF, sem afetar entretanto o conteúdo de p4EBP (Figura 3A). Além do tecido adiposo, nós investigamos também uma possível modulação da sinalização intracelular da via mTOR em macrófagos peritoneais. Similarmente ao tecido adiposo, o tratamento *in vivo* com rapamicina também foi eficiente em inibir mTORC1 em macrófagos peritoneais como evidenciado pela redução no conteúdo proteico de S6 fosforilada (Figura 3B). As demais proteínas estudadas, não sofreram alteração.

Figura 3 - Representativos do conteúdo de proteínas envolvidos na via da mTOR, no tecido adiposo (Painel A) e em macrófagos peritoneais (Painel B) de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou dieta rica em lipídios (60% de calorias em gorduras) e tratados com veículo ou rapamicina por gavagem (2 mg/kg/dia) durante 30 dias.

Após confirmar a eficiência da rapamicina em inibir o complexo 1 da mTOR,

investigamos os efeitos dessa inibição na massa corporal, ingestão alimentar e tolerância à glicose. Como ilustrado na Figura 4, o consumo da dieta HF por 30 dias aumentou o peso corporal, a massa dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e inguinal, além da eficiência energética (Figura 4A, C, D, E e F). Adicionalmente, esses animais apresentaram redução da ingestão alimentar medida em gramas de dieta (Figura 4B). Por outro lado, o tratamento com rapamicina não induziu alterações significativas nestes parâmetros. Não houve também alterações significativas no peso do fígado entre os diferentes grupos (Figura 4G). Em relação a homeostase da glicose, a ingestão de dieta HF induziu intolerância à glicose nesses animais, como evidenciado pelo teste de tolerância à glicose e pela maior área sob a curva, efeito este que foi significativamente exacerbado pelo tratamento com rapamicina (Figura 4H e I).

Figura 4 - A) Ganho de peso, B) Consumo alimentar, C) Eficiência energética, Peso do tecido adiposo: D) Retroperitoneal, E) Epididimal e F) Inguinal; H) Teste de tolerância à glicose (GTT) e I) Área sob a curva do GTT de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) e tratados com veículo ou rapamicina por gavagem (2 mg/kg/dia) durante 30 dias. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n = 8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. * diferença significativa entre grupos HFD + veículo e HFD + rapamicina. $p < 0,05$.

Posteriormente, nós avaliamos os efeitos da rapamicina no desenvolvimento de processo inflamatório no tecido adiposo associado a ingestão de dieta HF. Para isso, a fração do estroma-vascular do tecido adiposo foi isolada e analisada para a composição de leucócitos. Como não houve alterações significativas no número de células da fração estroma-vascular do tecido adiposo entre os diferentes tratamentos, os resultados de

caracterização do fenótipo dos leucócitos foram expressos em porcentagem de células. A ingestão de dieta HF por 30 dias associada ao tratamento com veículo não induziu alteração significativa na porcentagem de macrófagos totais (CD11b⁺ e F4/80⁺), M1 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD86⁺ e CD206⁻) e M2, células dendríticas naives (CD11c⁺) e ativadas (CD11c⁺ e CD86⁺), neutrófilos (Ly6G⁺) e linfócitos T (CD3⁺), B (CD19⁺), T helper naive (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁻) e ativado (CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD8⁻), T citotóxico (CD3⁺, CD8⁺ e CD4⁻) e T citotóxico ativado (CD3⁺, CD8⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD4⁻) da fração estroma-vascular do tecido adiposo (Figura 5). Já o tratamento com rapamicina, apesar de não alterar a porcentagem de macrófagos totais, aumentou significativamente a porcentagem de macrófagos pró-inflamatórios com fenótipo M1, linfócitos T citotóxicos e linfócitos T citotóxicos ativados (Figura 5A, 4B, 4K e 4L). Em contraste, não houve alteração significativa nas porcentagens de células dendríticas naives ou ativadas, neutrófilos, linfócitos B, T, e T helper naive entre os diferentes tratamentos (Figura 5D-J).

Figura 5 - A) Porcentagem de macrófagos totais (CD11b⁺ e F4/80⁺), B) Macrófagos com fenótipo M1 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD86⁺ e CD206⁻), C) Macrófagos com fenótipo M2 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD206⁺ e CD86⁻), D) Células dendríticas (CD11c⁺), E) Células dendríticas ativadas (CD11c⁺ e CD86⁺), F) Neutrófilos (Ly6G⁺), G) Linfócitos B (CD19⁺), H) Linfócitos T (CD3⁺), I) Linfócitos T helper (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁻), J) Linfócitos T helper ativados (CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD8⁻), K) Linfócitos T citotóxicos (CD3⁺, CD8⁺ e CD4⁻), L) Linfócitos T citotóxicos ativados (CD3⁺, CD8⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD4⁻) da fração estroma-vascular do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em

gorduras) e tratados com veículo ou rapamicina por gavagem (2 mg/kg/dia) durante 30 dias. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p<0,05$.

Similarmente ao encontrado na fração estroma-vascular, também não houve alterações significativas nas populações de linfócitos dos linfonodos após ingestão de dieta HF e tratamento com veículo (Figura 6). Já o tratamento com rapamicina reduziu significativamente a porcentagem de linfócitos T helper naive e ativado (Figura 6B e C) e aumentou a população de linfócito T citotóxico (Figura 6D).

Figura 6 - A) Porcentagem de linfócitos T (CD3⁺), B) Linfócitos T helper (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁻), C) Linfócitos T helper ativada (CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD8⁻) D) Linfócitos T citotóxicos (CD3⁺, CD8⁺ e CD4⁻), E) Linfócitos T citotóxicos ativados (CD3⁺, CD8⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD4⁻) do linfonodo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) e tratados com veículo ou rapamicina por gavagem (2 mg/kg/dia) durante 30 dias. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=8$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p<0,05$.

Com o objetivo de confirmar e aprofundar os dados obtidos na citometria, nós analisamos a expressão gênica de diversos marcadores de leucócitos e proteínas

inflamatórias no tecido adiposo dos camundongos. A ingestão de dieta HF associada ou não ao tratamento com rapamicina aumentou significativamente os níveis de mRNA das proteínas F4/80, iNOS, CD206 e IL10 (Figura 7A, F, H e P). A ingestão de dieta HF associada ao tratamento com rapamicina, entretanto, induziu aumento na expressão gênica de CD11b e CD86 (marcadores de macrófagos M0 e M1), TNF- α , IL-6 e MCP1 (mediadores pró-inflamatórios) e NLRP3, ASCPyCARD, DUSP6 e IL-1 β (componentes do inflamassoma) e arginase 1 (marcador de macrófagos M2) (Figura 7B, C, D, E, G, K, L, O, M e R). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de mRNA dos genes CLEC10a, caspase 1 e IL-18 entre os diferentes tratamentos (Figura 7J, N e Q).

Figura 7 - Expressão gênica de marcadores inflamatórios no tecido adiposo de camundongos C57BL6 alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) e tratados com veículo ou rapamicina por gavagem (2 mg/kg/dia) durante 30 dias. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

4.1.1 Efeito da inibição farmacológica dos complexos 1 e 2 da mTOR na polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2 *in vitro*

Com o intuito aprofundar nossos achados *in vivo*, investigamos uma possível modulação da polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e M2 após inibição farmacológica de mTORC1 e 2. Para isto, células mielóides de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* e estimuladas para a polarização em M1 ou M2 após tratamento com DMSO, rapamicina (inibidor do complexo 1 da mTOR) ou torina (inibidor dos complexos 1 e 2 da mTOR). O tratamento com coquetel de polarização tanto para M1 (LPS e IFN γ) quanto para M2 (IL-4 e IL-13) induziu um aumento significativo do conteúdo proteico de pS6 e pAkt Ser473, sendo este efeito mais pronunciado após estímulo de polarização para M1 (Figura 8 A e B). A polarização para M1, mas não para M2 induziu um aumento do conteúdo proteico de pNFkB (Figura 8C). No entanto, não foram encontradas diferenças no conteúdo de p4EBP após estímulo para polarização (Figura 8D).

Como esperado, tanto em macrófagos totais quanto M1 e M2, o tratamento com rapamicina reduziu o conteúdo proteico de pS6, mas não afetou o conteúdo de pAkt S473 e p4EBP (Figura 8 I, J, M e N). Somente em macrófagos M0 sem estímulo para polarização, o tratamento com rapamicina aumentou significativamente o conteúdo de pNFkB (Figura 8G). O tratamento com torina, entretanto, reduziu significativamente o conteúdo proteico de pS6, pAkt S473 e p4EBP em macrófagos M0, M1 e M2 e aumentou o conteúdo de pNFkB em macrófagos M0. Em macrófagos M2, o tratamento com torina também reduziu significativamente o conteúdo de NFkB (Figura 8E-H).

Controle sem tratamento

M0 sem estímulo para polarização

Macrófago M1

Macrófago M2

Figura 8 - Conteúdo de proteínas envolvidas na via da mTOR em macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO (Painéis A-D); Macrófagos controles (M0) tratados com DMSO, rapamicina ou torina (Painéis E-H); macrófagos M1 tratados com DMSO, rapamicina ou torina (Painéis I-L)

e macrófagos M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina (Painéis M-P). Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos in vitro após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico), tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados foram calculados com 3 camundongos por grupo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

A análise de citometria de fluxo demonstrou que, na ausência de qualquer estímulo para a polarização, a inibição farmacológica de mTORC1 e 2 com rapamicina e torina induziu a polarização espontânea de macrófagos para o fenótipo M1, mas não para o fenótipo M2 (Figura 9A e B). Por outro lado, o tratamento com torina, mas não rapamicina durante polarização para M1, reduziu significativamente a porcentagem de macrófagos com fenótipo M2 (Figura 9D), sem alterar a porcentagem de macrófagos com fenótipo M1 (Figura 9C). Corroborando estes dados, o tratamento com torina durante estímulo de polarização para M2 aumentou a porcentagem de macrófagos com fenótipo M1 (Figura 9E); e o tratamento tanto com rapamicina quanto com torina reduziram macrófagos com fenótipo M2 (Figura 9F).

Figura 9 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 na ausência de estímulo para polarização (M0, Painéis A e B), na polarização para M1 (Painéis C e D) e na polarização para M2 (painéis E e

F), após tratamento com DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas. Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico), tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

Posteriormente, investigamos se a inibição farmacológica de mTOR influencia, além do fenótipo dos macrófagos, a capacidade fagocítica destas células. Para isso, os níveis de nitrito no sobrenadante celular e a atividade fagocítica dos macrófagos derivados de medula óssea foram analisados. Como pode ser observado na Figura 10A, a inibição farmacológica de mTORC1 e 2 com torina, mas não a inibição de mTORC1 pela rapamicina, reduziu a produção de óxido nítrico de macrófagos polarizados para M1. Em macrófagos com fenótipo M0 e M2, não foram encontradas diferenças na produção de nitrito entre os tratamentos. Em relação a fagocitose, o tratamento com torina induziu um aumento significativo na atividade fagocítica somente em macrófagos M0. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para os fenótipos M1 ou M2 (Figura 10B).

Figura 10 - Produção de nitrito (A) e fagocitose (B) por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2. Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico),

tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=5. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

Investigamos também os efeitos da inibição farmacológica de mTOR na secreção de importantes citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos. Como pode ser observado na Figura 10, macrófagos com fenótipos M0 e M2 apresentaram secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em níveis abaixo ou muito próximo do limite de detecção do kit. Em macrófagos com fenótipo M1, entretanto, foi observado uma redução da secreção de TNF- α após tratamento com rapamicina e torina (Figura 11A). Já a secreção de IL-1 β e IL-6 foi reduzida após tratamento somente com torina (Figura 11B e C). Não foram encontradas diferenças significativas na secreção de IL-10 entre os tratamentos (Figura 11D).

Figura 11 - Secreção das citocinas TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2. Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos in vitro após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico), tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. n=6. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo (p<0,05).

Além da secreção de citocinas, a inibição farmacológica de mTOR produziu alterações importantes no metabolismo de glicose e ácidos graxos de macrófagos. Como ilustrado na Figura 12A e B, o tratamento com rapamicina e torina reduziu significativamente a produção de lactato em macrófagos M0, M1 e M2, sem afetar entretanto a oxidação deste hexose. Em relação ao metabolismo de ácidos graxos, o tratamento com torina reduziu a produção de CO₂ e TAG somente em macrófagos com fenótipo M2 (Figura 13).

Figura 12 - Produção de lactato (A) e oxidação da glicose (B) por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2. Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico), tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

Figura 13 - Produção de CO₂ (A) e TAG (B) por macrófagos M0, M1 e M2 tratados com DMSO, rapamicina ou torina e polarizado para M1 ou M2. Células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos C57BL6 foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* após adição de coquetel de diferenciação (DMEM, 30% meio de L929, 10% FBS e 1% de antibiótico), tratadas com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM), e induzidas a polarização para M1 (LPS e IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

IFN γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. n=6. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$).

4.2 Estudo 2: Efeito da superativação do complexo 1 da mTOR em macrófagos no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica

Neste estudo, avaliamos os efeitos da superativação crônica de mTOR na função de macrófagos de camundongos. Para isto, camundongos com deleção de TSC1 especificamente em células mielóides (MaTSC1KO) foram desenvolvidos através do sistema Cre-Lox. Esses animais e seus respectivos controles (MaTSC1WT) foram alimentados com dieta controle balanceada (controle) ou dieta HF por 8 semanas e avaliados para parâmetros inflamatórios e metabólicos.

A superativação de mTORC1 em células mielóides protegeu os animais MaTSC1KO do desenvolvimento da obesidade induzida por dieta, como evidenciado pelo reduzido ganho de peso corporal (Figura 14A), redução no peso dos diferentes tecidos adiposos (retroperitoneal, epididimal, inguinal e marrom), e fígado, quando comparados aos MaTSC1WT após ingestão de dieta HF (Figura 15A-D). Não houve porém diferença no peso do baço entre os grupos nas diferentes dietas (Figura 15E). Como ilustrado na Figura 14B, não houve diferença na ingestão alimentar de dieta controle ou HF entre os grupos, contudo os camundongos MaTSC1KO apresentaram uma menor eficiência energética após ingestão de dieta HF comparado com os camundongos MaTSC1WT (Figura 14C).

Figura 14 - A) Ganho de peso, B) consumo alimentar e C) eficiência energética em camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=6$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p<0,05$.

Figura 15 - Peso dos tecidos adiposos retroperitoneal (A), inguinal (B), epididimal (C), e marrom (D), fígado (E) e baço (F) de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=9$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. $p<0,05$.

Além de proteger os animais do desenvolvimento da obesidade, a superativação de mTORC1 em células mielóides atenuou a intolerância à glicose induzida pela ingestão da dieta HF, como pode ser observado pelo teste de tolerância à glicose (GTT) (Figura 16A), e área sob a curva (Figura 16B). Similarmente ao GTT, animais do grupo MaTSC1WT submetidos à dieta HF apresentaram intolerância à insulina quando comparados aos animais MaTSC1WT na dieta controle, não apresentando qualquer diferença em relação ao grupo MaTSC1KO (Figura 16C-D).

Figura 16 - A) Teste de tolerância à glicose (GTT), B) Área sob a curva, C) Teste de intolerância à insulina (ITT) e D) Velocidade de decaimento da glicemia no ITT (KITT) em camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=6$. * diferença significativa em comparação ao grupo MaTSC1WT com dieta controle. $p<0,05$.

Posteriormente, nós avaliamos os efeitos da superativação de mTORC1 em células mielóides no desenvolvimento do processo inflamatório no tecido adiposo associado a ingestão de dieta controle ou HF. Animais MaTSC1KO que ingeriram dieta HF por 8 semanas apresentaram menor infiltração de macrófagos (Figura 17A), células dendríticas (Figura 17I) e neutrófilos (Figura 17K) na fração estroma-vascular tecido adiposo comparado ao grupo MaTSC1WT.

Figura 17 - A) Porcentagem de macrófagos totais (CD11b⁺ e F4/80⁺), B) Macrófagos com fenótipo M1 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD86⁺ e CD206⁻), C) Macrófagos com fenótipo M2 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD206⁺ e CD86⁻), D) Linfócitos T (CD3⁺), E) Linfócitos T helper (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁻), F) Linfócitos T helper ativados (CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺, CD25⁺ e CD8⁻), G) Linfócitos T citotóxicos (CD3⁺, CD8⁺ e CD4⁻), H) Linfócitos B (CD19⁺), I) Células dendríticas (CD11c⁺), J) Células dendríticas ativadas (CD11c⁺ e CD86⁺), K) Neutrófilos (Ly6G⁺), da fração estroma-vascular do tecido adiposo epididimal de camundongos controles (MaTSC1WT) e com superativação de mTORC1 em macrófagos (MaTSC1KO) alimentados com dieta controle ou dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=12. * diferença significativa entre grupos. p<0,05.

Durante a realização dos experimentos *in vivo* evidenciamos que aproximadamente 63,2% dos camundongos MaTSC1KO apresentavam disfunção comportamental similares a crises convulsivas, principalmente quando em situações estressantes (como durante a manipulação). Aproximadamente 58,3% dos animais que apresentaram disfunção comportamental vieram a óbito durante os experimentos. Desta forma com o objetivo de confirmar se os efeitos observados nos animais MaTSC1KO eram devido a deleção de TSC1 em células mielóides e descartar a influência de uma possível deleção de TSC1 em outros tecidos como o sistema nervoso central, nós realizamos o transplante de células mielóides de camundongos MaTSC1KO e MaTSC1WT para camundongos TSC1 floxeados.

Como ilustrado na Figura 18A, os animais receptores das células MaTSC1KO não ganharam peso após ingestão de dieta HF diferentemente dos que receberam células dos animais MaTSC1WT. Apesar das alterações de ganho de peso, não houve diferença na tolerância à glicose entre os camundongos, provavelmente pelo baixo número amostral (n=3) (Figura 18B).

Figura 18 - Ganho de peso (Painel A) e teste de tolerância à glicose (GTT Painel B) de camundongos TSC floxeados transplantados com células de animais MaTSC1WT ou MaTSC1KO alimentados com dieta HF (60% de calorias em gorduras) por no mínimo 4 meses. Ganho de peso: MaTSC1WT n=8 e MaTSC1KO n=14. GTT: n=3 por grupo. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

Através da análise de citometria de fluxo foi possível verificar que os camundongos que receberam células dos animais MaTSC1KO apresentaram menor porcentagem de marcadores inflamatórios na fração estroma-vascular do tecido adiposo após 8 semanas de HFD, como evidenciado por uma menor população de macrófagos do fenótipo M1 (Figura 19B) e maior população de macrófagos do fenótipo M2 (Figura 19C).

Figura 19 - A) Porcentagem de macrófagos totais (CD11b⁺ e F4/80⁺), B) Macrófagos com fenótipo M1 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD86⁺ e CD206⁻), C) Macrófagos com fenótipo M2 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD206⁺ e CD86⁻), D) Linfócitos T (CD3⁺), E) Linfócitos T helper (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁻), F) Linfócitos T citotóxicos (CD3⁺, CD8⁺ e CD4⁻), G) Linfócitos B (CD19⁺), H) Células dendríticas (CD11c⁺), I) Células dendríticas ativadas (CD11c⁺ e CD86⁺) e J) Neutrófilos (Ly6G⁺) da fração estroma-vascular do tecido adiposo de camundongos TSC floxeados transplantados com células de camundongos controles (MaTSC1WT) ou com superativação de mTORC1 em macrófagos (MaTSC1KO) alimentados com dieta HF (60% de calorias em gorduras) durante 8 semanas. MaTSC1WT n=6 e MaTSC1KO n=4. * diferença significativa entre grupos. p<0,05.

4.3 Efeito da superativação de mTORC1 na polarização de macrófagos derivados de células mielóides para os fenótipos M1 e M2 *in vitro*

Para investigar o papel da superativação de mTORC1 na polarização de macrófagos, células mielóides derivadas da medula óssea de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO, foram diferenciadas em macrófagos *in vitro* e estimuladas para a polarização em M1 ou M2 na presença de DMSO, rapamicina ou torina por 24 horas. Aproximadamente 97,8% das células mielóides diferenciaram-se em macrófagos após estímulo com meio de L929 (n=8). A superativação de mTORC1 em células mielóides não afetou a diferenciação destas células para macrófagos.

Na ausência de qualquer estímulo para a polarização, a superativação de mTORC1 induziu um aumento da polarização espontânea de macrófagos para o fenótipo M2, sendo este efeito completamente bloqueado pelo tratamento com rapamicina e torina (Figura 20A e B).

Figura 20 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO sem estímulo para polarização, na presença de DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

A superativação de mTOR em macrófagos não afetou a polarização destas células para o fenótipo M1 induzida pelo estímulo com IFN- γ e LPS (Figura 21A e B), porém potencializou a polarização das mesmas para o fenótipo M2 após estímulo com IL-4 e IL-13 (Figura 22B), efeito este que foi completamente inibido pelo tratamento com

rapamicina e torina (Figura 22A e B).

Figura 21 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO após estímulo para polarização em M1 associado a tratamento com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

Figura 22 - Porcentagem de macrófagos M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO após adição de estímulo para polarização em M2 (IL-4 e IL-13) associado a tratamento com DMSO, rapamicina (100 nM) ou torina (250 nM) por 24 horas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=8. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p < 0,05$.

Como ilustrado na Figura 23, a superativação de mTOR não alterou a produção

de óxido nítrico por macrófagos em nenhuma das condições estudadas.

Figura 23 - Produção de nitrito por macrófagos M0, M1 e M2 de camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n=7$. Letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos. $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

A rapamicina é um macrolídeo utilizado no tratamento de doenças caracterizadas pela superativação de mTORC1 como a esclerose tuberosa (107, 108) e alguns tipos de câncer e como imunossupressor para evitar a rejeição de órgãos em pacientes transplantados (109). A rapamicina tem o seu uso limitado na prática clínica devido a indução de diversos desarranjos metabólicos similares aos encontrados no diabetes, como severa intolerância a glicose e dislipidemia (110, 111, 112, 113, 114, 115, 102).

A rapamicina induz hiperglicemia e intolerância a glicose por aumentar a gliconeogênese hepática (102) e prejudicar a captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético (103). Surpreendentemente, a rapamicina induz resistência à insulina, apesar de inibir mTORC1 e aliviar a retroalimentação negativa mediado por S6K na função IRS-1 (100, 102, 116), efeito este que pode, em parte, ser devido à inibição de mTORC2 e reduzida fosforilação de Akt (104, 117). Interessantemente, a ativação farmacológica de PPAR γ com a tiazolidinediona rosiglitazona atenua parcialmente a intolerância a glicose e resistência a insulina induzida pelo tratamento com rapamicina (97). Diversos mecanismos podem estar envolvidos neste efeito benéfico da rosiglitazona incluindo o aumento da secreção de adiponectina e redução de processos pró-inflamatórios.

O desenvolvimento do processo inflamatório no tecido adiposo e diversos tecidos corporais está diretamente associado com a indução de resistência a insulina e desarranjos na homeostase da glicose. Desta forma, nós realizamos diversos experimentos para investigar a hipótese de que parte dos desarranjos metabólicos induzidos pela rapamicina são desencadeados pela exacerbação de processos inflamatórios associados a inibição de mTOR.

Como nosso estudo envolve a avaliação de parâmetros inflamatórios, optamos por administrar a rapamicina na forma de gavagem para evitar o desenvolvimento de processo inflamatório intraperitoneal que poderia resultar de injeções diárias de rapamicina neste compartimento. De maneira geral, como detalhado abaixo, a administração de rapamicina por gavagem foi tão efetiva em inibir mTORC1 quanto a

administração intraperitoneal (102).

Confirmando estudos anteriores (118, 50), a ingestão de dieta HF induziu um aumento na atividade do complexo 1 da mTOR em adipócitos, mas não em macrófagos peritoneais, como evidenciado pelo aumento do conteúdo de pS6 e p4E-BP. A análise do conteúdo de substratos de mTORC1 e 2 em nosso estudo indicam que a rapamicina inibiu a atividade de mTORC1, mas não mTORC2, como evidenciado pelo reduzido conteúdo de pS6 e ausência de alteração em pAkt Ser473 no tecido adiposo e macrófagos peritoneais. No tecido adiposo, a rapamicina, não só não inibiu mTORC2, como bloqueou o efeito inibitório da dieta HF no conteúdo de pAkt Ser473, provavelmente devido a inibição da retroalimentação negativa exercida por S6K na atividade de IRS-1. Importante ressaltar que a rapamicina não inibiu completamente a atividade de mTORC1 como pode ser evidenciado pela ausência de alterações significativas no conteúdo de p4E-BP após tratamento com este macrolídeo. Estes dados confirmam a ação inibitória parcial da rapamicina na atividade de mTORC1 reduzindo a fosforilação de alguns, mas não todos substratos deste complexo.

Apesar de restaurar a fosforilação e assim atividade da Akt para níveis normais no tecido adiposo, o tratamento com a rapamicina exacerbou a intolerância a glicose induzida pela ingestão de dieta HF, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos, não associados a Akt, no desarranjos da homeostase da glicose induzido por este macrolídeo.

Neste sentido é importante ressaltar que em associação a intolerância à glicose, o tratamento com rapamicina promoveu processo inflamatório no tecido adiposo, como evidenciado pelo aumento da infiltração de macrófagos com fenótipo M1, linfócitos T citotóxicos naives e ativados neste tecido. Este perfil pró-inflamatório do tecido adiposo também foi evidenciado pelo aumento induzido pela rapamicina na expressão de diversas proteínas inflamatórias como CD11c, CD86, TNF- α , IL-6, MCP1 e IL-1 β em comparação aos camundongos que receberam HF e veículo. Um outro dado interessante encontrado em nosso estudo foi o aumento induzido pela rapamicina na expressão gênica de diversas proteínas que compõem o inflamassoma como a NLRP3, ASCPyCARD, DUSP6 e IL-1 β sugerindo um possível envolvimento desta via na resposta pró-inflamatória do tecido adiposo induzida pela inibição farmacológica de

mTORC1. O inflamassoma é uma via multiprotéica do sistema imune inato que desempenha função importante na resposta do hospedeiro à infecções através do controle da maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-18 em respostas a patógenos intracelulares e outros sinais de perigo para a célula (119). A proteína NLRP3 (também conhecido como NALP3) (120), além de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a lesão (DAMPs), pode também perceber distúrbios na homeostase celular como a produção elevada de espécies reativas de oxigênio e a disfunção mitocondrial, entre outros (121). Estudos indicam que o NLRP3-inflamassoma está ativado em macrófagos infiltrados no tecido adiposo visceral de pacientes obesos com distúrbios metabólicos contribuindo para o desenvolvimento da inflamação local e resistência à insulina (122). Confirmando esta hipótese, a deficiência de NLRP3 protege parcialmente camundongos da intolerância à glicose associada a obesidade (123). Apesar do aumento na expressão gênica de diversos componentes do inflamassoma no tecido adiposo, a ausência de medidas do conteúdo tecidual de caspase-1, IL-1 β e IL-18 impede uma conclusão definitiva sobre a participação desta via na inflamação do tecido adiposo induzido pela rapamicina. Estudos futuros serão necessários para este fim, bem como, para avaliarmos a contribuição de macrófagos e adipócitos individualmente na ativação do inflamassoma no tecido adiposo e a contribuição desta via para a intolerância a glicose induzida pela rapamicina. Especificamente em relação a este último objetivo, estudos preliminares de nosso grupo indicam que camundongos deficientes de NLRP3 estão parcialmente protegidos da intolerância a glicose induzida pela rapamicina (dados não mostrados).

Como os macrófagos desempenham papel importante no desenvolvimento do processo inflamatório no tecido adiposo, nós investigamos posteriormente o efeito da inibição farmacológica de mTOR na polarização e função de macrófagos *in vitro*. Interessantemente, a ativação de mTORC1 parece ser um evento comum na polarização de macrófagos derivados da medula óssea, tanto para o fenótipo pró-inflamatório M1 quanto para o fenótipo anti-inflamatório M2, como evidenciado pelo aumento do conteúdo de pS6 após tratamento de macrófagos com IFN- γ + LPS e IL-4 + IL-13, respectivamente. O mesmo não foi observado para mTORC2, cuja a atividade foi

aumentada apenas após a polarização para M1, como podemos observar com o aumento da pAkt Ser473 em macrófagos com fenótipo M1 e não com o fenótipo M2. Similarmente a atividade de mTORC1, houve aumento do conteúdo de pNFkB p65 Ser536 tanto na polarização para macrófago M1 quanto M2, indicando que este fator de transcrição, apesar de ser considerado como pró-inflamatório, pode ser importante também na determinação dos eventos transcripcionais associados ao fenótipo anti-inflamatório M2. Estudos futuros são necessários na compreensão do envolvimento e função de NFkB na polarização para M1 e M2.

A ativação de mTORC1 na polarização de macrófagos para M1 e M2 e a ativação de mTORC2 na polarização para M1, nos motivou a tentar compreender o envolvimento destes complexos nas alterações funcionais e metabólicas que ocorrem em macrófagos durante estes processos. Para isto experimentos de perda de função utilizando inibição farmacológica de mTORC1 e 2 com rapamicina e torina foram realizados. Similarmente ao encontrado *in vivo*, o tratamento de macrófagos com rapamicina *in vitro* inibiu seletivamente a atividade quinase de mTORC1 para S6K-S6, sem afetar o conteúdo de p4EBP. Já a torina promoveu inibição total de mTORC1, como evidenciado pela redução do conteúdo de pS6 e p4EBP, bem como, a inibição de mTORC2 evidenciada pela redução no conteúdo de pAkt Ser473. Este padrão de inibição parcial de mTORC1 pela rapamicina e total de mTORC1 e 2 pela torina ocorreu independentemente do estado de ativação de macrófagos, ou seja, em macrófagos M0 (sem estímulo para polarização), M1 e M2. Como mencionado anteriormente, a maior potência da torina em inibir mTORC1 e 2 está associada com sua alta afinidade para o sítio de ATP na mTOR bloqueando, independentemente do complexo, sua atividade quinase (124).

De maneira geral, os efeitos da inibição farmacológica de mTORC1 e 2 com rapamicina e torina foram específicos ao fenótipo dos macrófagos investigados. Em macrófagos M0, ou seja, na ausência de qualquer estímulo de polarização, os tratamentos com rapamicina ou torina promoveram resposta pró-inflamatória como evidenciado pelo aumento no conteúdo de pNFkB p65 Ser536, maior polarização espontânea destas células para o fenótipo M1 e elevada secreção de TNF- α e atividade fagocítica. Estes dados *in vitro* corroboram com a maior polarização de macrófagos

residentes no tecido adiposo para o fenótipo M1 encontrada após tratamento *in vivo* com rapamicina. Importante ressaltar que esta resposta pró-inflamatória de macrófagos induzida pela rapamicina e torina foi associada com uma redução na glicólise e produção de lactato, uma via metabólica que é ativada por LPS e outros estímulos pró-inflamatórios na polarização de macrófagos para o fenótipo M1 (125, 126). Estudos futuros são necessários para desvendar os mecanismos pelos quais as inibições de mTORC1 e 2 promovem resposta pró-inflamatória em macrófagos na ausência de estímulo.

Apesar de promover resposta pró-inflamatória em macrófagos M0, a inibição farmacológica de mTORC1 e 2 não afetou a polarização para o fenótipo M1 medido pela porcentagem de células positivas para CD11b+, F4/80+, CD86+ e CD206-, mas reduziu a produção de óxido nítrico, a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzidos pelo LPS e IFN- γ nestas células. Ao contrário da secreção, não foram encontradas alterações no conteúdo de pNFkB p65 Ser536 e fagocitose de macrófagos M1 após tratamento com rapamicina ou torina. Importante ressaltar que a menor atividade secretória de macrófagos M1 induzida pela inibição de mTORC1 e 2 está associada com uma redução da glicólise e produção de lactato e da oxidação da glicose, indicando, que ao contrário do que ocorre em macrófagos M0, existe uma associação entre metabolismo e função secretória em macrófagos M1. Estes dados indicam que mTORC1 e 2 são importantes mediadores das alterações metabólicas (aumento da glicólise e produção de lactato) e da atividade secretória de macrófagos M1 induzidas por LPS e IFN- γ .

Ao contrário de macrófagos M1, a inibição de mTORC1 e 2 reduziu o conteúdo de pNFkB p65 Ser536 e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, mas promoveu maior polarização para fenótipo M1 após estímulo com IL-4 e IL-13. Esta maior polarização para M1 na presença de conteúdo reduzido de pNFkB p65 Ser536 é contraditória a função deste fator de transcrição como indutor da expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias e assim precisa ser melhor investigada. Apesar da ausência de alterações significativas na produção de óxido nítrico, fagocitose e secreção de interleucinas 1 β , 6 e 10 e TNF- α , a inibição de mTORC1 e 2 reduziu significativamente a produção de lactato e a oxidação e incorporação de ácidos graxos em triacilglicerol

em macrófagos M2. Em conjunto estes dados indicam que níveis adequados de atividade dos complexos 1 e 2 da mTOR são importantes na polarização de macrófagos para o fenótipo M2 e metabolismo glicolítico e oxidativo de ácidos graxos nestas células.

Corroborando com estes dados, o tratamento de macrófagos humanos *in vitro* com rapamicina (10 ng/mL) reduziu a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, mas não para M1, apesar de aumentar a expressão gênica de CD86, receptor de quimiocina C-C do tipo 7 (CCR7), IL-6, TNF- α e IL-1 β (127). Resultado semelhante foi encontrado em células dendríticas mielóides humanas na presença da rapamicina, onde ocorreu um aumento da expressão de CD86 e CCR7 associada com uma diminuição da IL-10 (128).

Em conjunto, nossos dados indicam que a inibição farmacológica de mTOR, por mecanismos ainda desconhecidos, promove o desenvolvimento de processo inflamatório no tecido adiposo *in vivo* e em macrófagos *in vitro*. Com o objetivo de aprofundar os achados obtidos com inibição farmacológica e melhor compreender o envolvimento de mTORC1 no desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associada a obesidade e na polarização e função de macrófagos, camundongos com ativação constitutiva do complexo 1 da mTOR exclusivamente em células mielóides foram produzidos, desafiados com dieta HF e avaliados para diversos parâmetros metabólicos e inflamatórios.

Interessantemente, camundongos com superativação de mTOR, apresentaram proteção contra o desenvolvimento da obesidade, como evidenciado pela completa ausência de ganho de peso corporal e aumento de massa de todos os depósitos de gordura estudados (retroperitoneal, inguinal, epididimal e BAT) após ingestão de dieta HF. Como o peso corporal é definido pelo equilíbrio entre o consumo alimentar e gasto energético, a ausência de diferenças de ingestão alimentar entre camundongos MaTSC1WT e MaTSC1KO indicam uma menor eficiência energética e assim maior gasto calórico como provável causa da ausência de ganho de peso dos animais MaTSC1KO após ingestão de dieta HF. Além da obesidade, camundongos MaTSC1KO apresentaram proteção contra o desenvolvimento de intolerância a glicose e à insulina induzida pela dieta HF.

É importante ressaltar, entretanto, que aproximadamente 60% dos camundongos com deficiência de TSC1 em células mielóides (MaTSC1KO) apresentaram graves disfunções comportamentais e espasmos musculares intensos similares a crises convulsivas, indicando provavelmente que a expressão da Cre Recombinase não se restringe exclusivamente as células mielóides. Neste sentido, uma iniciativa recente da empresa Jackson Laboratories, USA, de caracterização da expressão da Cre Recombinase sob o controle do promotor da Lisozima M realizou o cruzamento destes animais com camundongos lacZ Cre-reporter strain, B6.129S4-*Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sorl}* J e encontrou níveis elevados de expressão de Cre em diversos núcleos do sistema nervoso central que poderiam estar envolvidos na disfunção comportamental apresentada por estes camundongos. Desta forma, com objetivo de investigar se a proteção contra o desenvolvimento da obesidade e intolerância a glicose seriam devido a deleção de TSC1 em células mielóides, nós realizamos o transplante destas células em camundongos controles e avaliamos a resposta dos mesmos a dieta HF.

Interessantemente, apesar do número pequeno de animais utilizados nestes experimentos, podemos notar que os camundongos que receberam o transplante de células mielóides deficientes em TSC1 também foram protegidos do desenvolvimento da obesidade, mas não da intolerância a glicose induzida pela dieta HF. Analisando o perfil de leucócitos no tecido adiposo dos camundongos que receberam transplante de células mielóides de animais MaTSC1KO, pudemos observar uma redução da infiltração de macrófagos com fenótipo M1 e um aumento nos de fenótipo M2 neste tecido. Estes dados são exatamente opostos aos observados após inibição farmacológica de mTOR com rapamicina *in vivo*, que promoveu um aumento no número de macrófagos M1 e redução de M2 no tecido adiposo.

Desta forma, os resultados obtidos no experimento de transplante nos permite sugerir que a superativação de mTORC1 exclusivamente em células mielóides responde, pelo menos em parte, pela proteção contra o desenvolvimento da obesidade induzida pela ingestão de dieta HF observada nos camundongos com disfunção comportamental, bem como, promove polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Os mecanismos responsáveis por estes fenótipos, entretanto, precisam ser elucidados.

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos *in vivo*, avaliamos também o

efeito da ativação constitutiva de mTORC1 na polarização de macrófagos *in vitro*. Similarmente ao encontrado *in vivo*, a superativação de mTORC1 induziu um aumento da polarização, tanto espontânea como estimulada por IL-4 e IL-13, de macrófagos para o fenótipo M2, efeitos estes que foram bloqueados pelo tratamento com rapamicina e torina.

Corroborando estes achados, células embrionárias de camundongos deficientes em TSC2 apresentam reduzida ativação de NFkB em resposta ao LPS (95) e o *knockdown* de TSC2 em monócitos promove maior polarização para o fenótipo M2 e secreção de IL-10 e menor secreção de IL-12 (129). Byles et al., entretanto, encontraram resultado oposto em camundongos TSC1 deficientes, ou seja, uma redução na polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (130). Estas discrepâncias entre estudos podem estar associadas ao uso de diferentes modelos animais e diferentes métodos de análise da polarização de macrófagos.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados indicam que a atividade do complexo 1 da mTOR atenua o desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo associada a obesidade por um mecanismo que envolve a maior polarização de macrófagos para o fenótipo M2.

REFERÊNCIAS*

1. MITTENDORFER, B. Origins of metabolic complications in obesity: adipose tissue and free fatty acid trafficking. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 535-541, 2011.
2. RICHARD, D. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. **Nature Reviews: Endocrinology**, v. 11, n. 8, p. 489-501, 2015.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Jan. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >. Acesso em: 31 ago. 2015.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nutrition. Disponível em: < <http://www.who.int/nutrition/challenges/en/> >. Acesso em: 31 ago. 2015.
5. SEMENKOVICH, C. F. Insulin resistance and atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1813-22, 2006.
6. MALNICK, S. D.; KNOBLER, H. The medical complications of obesity. **QJM**, v. 99, n. 9, p. 565-79, 2006.
7. IKEOKA, D.; MADER, J. K.; PIEBER, T. R. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 116-21, 2010.
8. RIZVI, A. A. Hypertension, obesity, and inflammation: the complex designs of a deadly trio. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 8, n. 4, p. 287-94, 2010.
9. FORMIGUERA, X.; CANTON, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 6, p. 1125-46, 2004.
10. ALLISON, D. B.; SAUNDERS, S. E. Obesity in North America. An overview. **Medical Clinics of North America**, v. 84, n. 2, p. 305-32, v, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

11. GOLAY, A.; YBARRA, J. Link between obesity and type 2 diabetes. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 649-63, 2005.
12. WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.
13. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. Jan. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> >. Acesso em: 31 ago. 2015.
14. PRADHAN, A. D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 3, p. 327-34, 2001.
15. DUNCAN, B. B. et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1799-805, 2003.
16. TATARANNI, P. A.; ORTEGA, E. A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 917-27, 2005.
17. HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.
18. AMARAL, M. E. et al. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 1, p. 203-12, 2006.
19. HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, 2006.
20. SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, 2006.
21. GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews: Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-64, 2005.

22. EHSES, J. A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2356-70, 2007.
23. RICHARDSON, S. J. et al. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 8, p. 1686-8, 2009.
24. LEE, J. Y.; HWANG, D. H. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. **Molecules and Cells**, v. 21, n. 2, p. 174-85, 2006.
25. TSUKUMO, D. M. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-98, 2007.
26. MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359-70, 2009.
27. POHL, J. et al. Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. **Biochemistry**, v. 43, n. 14, p. 4179-87, 2004.
28. LARBI, A. et al. Acute in vivo elevation of intravascular triacylglycerol lipolysis impairs peripheral T cell activation in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 5, p. 949-56, 2005.
29. GOODPASTER, B. H.; THAETE, F. L.; KELLEY, D. E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 885-92, 2000.
30. GRECO, A. V. et al. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 144-51, 2002.
31. MIYAZAKI, Y. et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2784-91, 2002.
32. SEPPALA-LINDROOS, A. et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids

independent of obesity in normal men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3023-8, 2002.

33. UNGER, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. **Diabetes**, v. 44, n. 8, p. 863-70, 1995.

34. MCGARRY, J. D. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 7-18, 2002.

35. BLACK, D. D. et al. Intestinal lipoproteins in the rat with D-(+)-galactosamine hepatitis. **Journal of Lipid Research**, v. 24, n. 8, p. 977-92, 1983.

36. VREUGDENHIL, A. C. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1399-405, 2003.

37. WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1431-3, 1990.

38. SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n. 1, p. 8-26, 1996.

39. CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-72, 2007.

40. CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, 2008.

41. WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, 2003.

42. ISAKSON, P. et al. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1550-7, 2009.

43. CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Reviews: Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738-49, 2011.

44. LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-84, 2007.
45. KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 26-34, 2012.
46. PRIEUR, X. et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 797-809, 2011.
47. HOTAMISLIGIL, G. S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 923-34, 2008.
48. LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457-68, 2002.
49. LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, 2012.
50. KHAMZINA, L. et al. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1473-81, 2005.
51. DANN, S. G.; SELVARAJ, A.; THOMAS, G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 252-9, 2007.
52. GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, 2007.
53. HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177-89, 2002.
54. KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-75, 2002.

55. SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-501, 2008.
56. JUNG, C. H. et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 7, p. 1992-2003, 2009.
57. GUERTIN, D. A. et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. **Developmental Cell**, v. 11, n. 6, p. 859-71, 2006.
58. OSHIRO, N. et al. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20329-39, 2007.
59. SANCAK, Y. et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Molecular Cell**, v. 25, n. 6, p. 903-15, 2007.
60. THEDIECK, K. et al. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. **PloS One**, v. 2, n. 11, p. e1217, 2007.
61. VANDER HAAR, E. et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 316-23, 2007.
62. WANG, L.; HARRIS, T. E.; LAWRENCE, J. C., JR. Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15619-27, 2008.
63. PETERSON, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873-86, 2009.
64. SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. 1296-302, 2004.
65. FRIAS, M. A. et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. **Current Biology**, v. 16, n. 18, p. 1865-70, 2006.

66. JACINTO, E. et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 125-37, 2006.
67. WOO, S. Y. et al. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 35, p. 25604-12, 2007.
68. POTTER, C. J.; PEDRAZA, L. G.; XU, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 658-65, 2002.
69. JOZWIAK, J. et al. Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway. **Neuromolecular Medicine**, v. 7, n. 4, p. 287-96, 2005.
70. HAN, S.; KHURI, F. R.; ROMAN, J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 315-23, 2006.
71. O'REILLY, K. E. et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1500-8, 2006.
72. ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21-35, 2011.
73. POLAK, P.; HALL, M. N. mTOR and the control of whole body metabolism. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 209-18, 2009.
74. JUNG, C. H. et al. mTOR regulation of autophagy. **FEBS Letters**, v. 584, n. 7, p. 1287-95, 2010.
75. THOMAS, G.; HALL, M. N. TOR signalling and control of cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 782-7, 1997.
76. SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253-62, 2000.

77. RICHTER, J. D.; SONENBERG, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**, v. 433, n. 7025, p. 477-80, 2005.
78. LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589-94, 2009.
79. HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125-31, 2002.
80. GANLEY, I. G. et al. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297-305, 2009.
81. HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-91, 2009.
82. VEILLEUX, A. et al. Chronic inhibition of the mTORC1/S6K1 pathway increases insulin-induced PI3K activity but inhibits Akt2 and glucose transport stimulation in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 4, p. 766-78, 2010.
83. JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1122-8, 2004.
84. MEMMOTT, R. M.; DENNIS, P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 656-64, 2009.
85. MURAYAMA, T. et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 5, p. 782-8, 2009.
86. SANTOS, R. X. et al. Effects of rapamycin and TOR on aging and memory: implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 6, p. 927-36, 2011.
87. YIP, C. K. et al. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. **Molecular Cell**, v. 38, n. 5, p. 768-74, 2010.

88. POWELL, J. D. et al. Regulation of immune responses by mTOR. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 39-68, 2012.
89. SAUNDERS, R. N.; METCALFE, M. S.; NICHOLSON, M. L. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. **Kidney International**, v. 59, n. 1, p. 3-16, 2001.
90. LIU, Q. et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2574-86, 2013.
91. MONDINO, A.; MUELLER, D. L. mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 162-72, 2007.
92. LEE, D. F. et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 440-55, 2007.
93. CAO, W. et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. **Nature Immunology**, v. 9, n. 10, p. 1157-64, 2008.
94. DELGOFFE, G. M. et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 832-44, 2009.
95. WEICHHART, T. et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 565-77, 2008.
96. OHTANI, M. et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 635-43, 2008.
97. FESTUCCIA, W. T. et al. PPARgamma activation attenuates glucose intolerance induced by mTOR inhibition with rapamycin in rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 9, p. E1046-54, 2014.
98. TREMBLAY, F. et al. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1901-10, 2001.

99. TREMBLAY, F. et al. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1328-37, 2005.
100. TREMBLAY, F. et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 35, p. 14056-61, 2007.
101. UM, S. H.; D'ALESSIO, D.; THOMAS, G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 393-402, 2006.
102. HOUDE, V. P. et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. **Diabetes**, v. 59, n. 6, p. 1338-48, 2010.
103. DEBLON, N. et al. Chronic mTOR inhibition by rapamycin induces muscle insulin resistance despite weight loss in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2325-40, 2012.
104. LAMMING, D. W. et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. **Science**, v. 335, n. 6076, p. 1638-43, 2012.
105. FESTUCCIA, W. T. et al. Myeloid-specific Rictor deletion induces M1 macrophage polarization and potentiates in vivo pro-inflammatory response to lipopolysaccharide. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e95432, 2014.
106. FESTUCCIA, W. T. et al. Depot-specific effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on adipose tissue glucose uptake and metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 6, p. 1185-94, 2009.
107. NORTHROP, H.; KOENIG, M. K.; AU, K. S. Tuberous Sclerosis Complex. In: PAGON, R. A.; ADAM, M. P., *et al* (Ed.). **GeneReviews(R)**. Seattle (WA), 1993.
108. MENON, S.; MANNING, B. D. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. **Oncogene**, v. 27 Suppl 2, p. S43-51, 2008.

109. BARLOW, A. D.; NICHOLSON, M. L.; HERBERT, T. P. Evidence for rapamycin toxicity in pancreatic beta-cells and a review of the underlying molecular mechanisms. **Diabetes**, v. 62, n. 8, p. 2674-82, 2013.
110. BRATTSTROM, C. et al. Hypertriglyceridemia in renal transplant recipients treated with sirolimus. **Transplantation Proceedings**, v. 30, n. 8, p. 3950-1, 1998.
111. MORRISETT, J. D. et al. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 8, p. 1170-80, 2002.
112. AGGARWAL, D.; FERNANDEZ, M. L.; SOLIMAN, G. A. Rapamycin, an mTOR inhibitor, disrupts triglyceride metabolism in guinea pigs. **Metabolism**, v. 55, n. 6, p. 794-802, 2006.
113. FRAENKEL, M. et al. mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 945-57, 2008.
114. MALIZZIA, L. J.; HSU, A. Temsirolimus, an mTOR inhibitor for treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 12, n. 4, p. 639-46, 2008.
115. FERNANDEZ-BUSSY, S. et al. Sirolimus-induced severe hypertriglyceridemia in a lung transplant recipient. **Transplantation**, v. 89, n. 4, p. 481-2, 2010.
116. VEILLEUX, A. et al. Chronic inhibition of the mTORC1/S6K1 pathway increases insulin-induced PI3K activity but inhibits Akt2 and glucose transport stimulation in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 4, p. 766-78, 2010.
117. YE, L. et al. Rapamycin has a biphasic effect on insulin sensitivity in C2C12 myotubes due to sequential disruption of mTORC1 and mTORC2. **Frontier in Genetics**, v. 3, p. 177, 2012.
118. UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200-5, 2004.
119. KURABI, A. et al. The inflammasome adaptor ASC contributes to multiple innate immune processes in the resolution of otitis media. **Innate Immunity**, 2014.

120. MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature Reviews: Immunology**, v. 9, n. 4, p. 287-93, 2009.
121. GURUNG, P.; LUKENS, J. R.; KANNEGANTI, T. D. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 193-201, 2015.
122. ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2014.
123. ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136-40, 2010.
124. THOREEN, C. C. et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 8023-32, 2009.
125. BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 432-7, 2012.
126. O'NEILL, L. A.; HARDIE, D. G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 346-55, 2013.
127. MERCALLI, A. et al. Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. **Immunology**, v. 140, n. 2, p. 179-90, 2013.
128. SORDI, V. et al. Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin. **Transplantation**, v. 82, n. 6, p. 826-34, 2006.
129. CHEN, W. et al. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. **Cancer Research**, v. 72, n. 6, p. 1363-72, 2012.
130. BYLES, V. et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. **Nature Communications**, v. 4, p. 2834, 2013.