

NAYARA PEREIRA

**LEUCOTRIENOS NO DIABETES TIPO 1:
ATIVAÇÃO DE UM FENÓTIPO
IMUNOMÉTABOLICO DISTINTO EM
MACRÓFAGOS**

NAYARA PEREIRA

**LEUCOTRIENOS NO DIABETES TIPO 1:
ATIVAÇÃO DE UM FENÓTIPO
IMUNOMETABOLICO DISTINTO EM
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2021

NAYARA PEREIRA

**LEUCOTRIENOS NO DIABETES TIPO 1:
ATIVAÇÃO DE UM FENÓTIPO
IMUNOMETABOLICO DISTINTO EM
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia
Orientador: Prof(a) Dr(a). Sonia Jancar
Coorientador: Prof(a) Dr(a). Theresa Ramalho

Versão original.

São Paulo

2021

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
(CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo

Pereira , Nayara
Leucotrienos no diabetes tipo 1: ativação de um fenótipo
imunometabólico distinto em macrófagos/ Nayara Pereira –
São Paulo, 2021.

Orientadora: Profª Drª Sonia Jancar

Dissertação(Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:

Imunologia.

Linha de Pesquisa: Imunofarmacologia dos Mediadores
Lipídicos.

Versão do título para o inglês: Leukotrienes in diabetes type 1:
Activation of a distinct immunometabolic phenotype in
macrophages.

1. Diabetes tipo 1; 2. leucotrienos; 3. Inflamação; 4. polarização de
macrófagos; 5. metabolismo energético. I. Jancar, Sonia, orientadora.
II. Ramalho, Theresa, coorientadora.

III. Título

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nayara Pereira

Título da Dissertação: **Leucotrienos no Diabetes tipo 1:Ativação de um fenótipo imunometabólico distinto em macrófagos**

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Jancar

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.61.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **008/2014/CEUA**, válido até 31/03/2022, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Sônia Jancar**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Nayara Pereira** ao Projeto de Pesquisa "*O papel do LTB4 no estado inflamatório sistêmico induzido pela diabetes*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto. Ressalto que na renovação do referido certificado não foram incluídos mais animais.

São Paulo, 09 de maio de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, em São Paulo, SP, Brasil. Recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Parte deste trabalho foi desenvolvido na Vanderbilt Institute for Infection, Immunology and Inflammation da Vanderbilt University Medical Center (VUMC), Nashville, Tennessee, Estados Unidos, com apoio financeiro da FAPESP.

AGRADECIMENTOS

Peço licença ao meu texto científico para ser poética em meus agradecimentos pois por trás de cada linha escrita racionalmente existe um ser humano. O mestrado foi uma etapa exigente e ao mesmo tempo generosa. Por isso, agradeço especialmente a mim mesma por ter resistido e conseguido vencer cada barreira que surgiu no caminho, compreendendo no final como essa etapa me ensinou tanto em tão pouco tempo.

Agradeço aos meus pais, Maria Helena e João Herbert por aceitarem minhas decisões e sempre fazerem de tudo para me ajudar. Sei que sofreram quando eu decidi encarar São Paulo sozinha e sofreram ainda mais quando eu decidi passar seis meses no exterior e fui pega de surpresa por uma pandemia. Vocês nunca deixaram de me apoiar. À minha irmã Josi Pereira, a qual me orgulho muito e que sempre me lembra que não viemos ao mundo para ter pouco.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Sonia Jancar por ter me aceitado como aluna de mestrado. Sonia, você é um grande exemplo de que mulheres cientistas são capazes de chegarem tão longe quanto elas quiserem. Nunca vou me esquecer de você me contando suas histórias sobre seu contato com o pesquisador que caracterizou os leucotrienos e sobre como você começou na USP. Quero um dia fazer os olhos de meus alunos brilharem como você fez os meus com essas histórias.

Agradeço à Dr^a Theresa Ramalho, minha coorientadora, por ter sido tão paciente e amiga todo esse tempo. Obrigada por ter me ensinado tanta coisa que nem sei dizer. Você é um grande exemplo pessoal e profissional que eu levarei comigo. Eu sempre vou repetir que quando crescer quero ser uma jovem cientista como você: Inteligente, forte, corajosa e determinada. Nossa colaboração não terminou e mesmo longe vamos continuar com nossas ideias de pesquisas ambiciosas.

Agradeço à Marlise Montes , especialista de laboratório, que me ensinou muito e fez muito por mim. Sem a Marlise eu não saberia nem mesmo acertar um pH .Quando alguém tinha uma dúvida minha fala era “A Marlise deve saber” e ela sempre sabia. Marlise maravilhosa, você foi essencial.

Agradeço aos meus colegas de Lab, Ana Chiacetti e João Pedro Guimarães (Flávia Sardela também) por todas as idas ao bandeirão, conversas, experimentos, vocês

vão fazer falta ! Ao Ildefonso Júnior por toda ajuda com os experimentos e por sempre alegrar o lab. Não poderia faltar uma obrigada a Sil (Silvana Silva) que foi sempre solícita em ajudar a mim e ao lab.

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação em imunologia, especialmente o Tiago Francisco por todos os momentos de tristeza e alegrias que dividimos. E ao Profº Niels Olsen por todo apoio que deu para o desenvolvimento de meu projeto e pela ajuda com a manutenção dos meus animais no biotério.

Não poderia deixar de agradecer ao Profº William Festuccia e seus alunos queridos Caroline Tomazelli, Érique Casto e Gustavo Gilio pela ajuda imensa que me deram nos experimentos com tecido adiposo e metabolismo.

Agradeço ao Drº Henrique Serezani pela oportunidade em seu lab na VUMC e pelo apoio que me deu quando cheguei. Aos brasileiros que me ajudaram muito em Nashville: Júlia Bazzano, Andressa Scussel, Flaviane Silva e Paulo de Melo e aos companheiros gringos da VUMC: Amondrea Blackman e Nathan Klopfenstein.

Agradeço à Isabelle e Letty Kazarian com as quais tive o prazer de dividir um teto em Nashville. Nunca imaginei que em outro país eu encontraria uma amiga tão querida como a Izzy que fez tanto por mim.

Agradeço à Susana, Monique, Flávia e ao Lucas por essa amizade incrível que temos há mais de 10 anos e pelas risadas infinitas que damos quando estamos juntos. Estar com vocês é sempre a melhor maneira de aliviar o estresse da vida.

Agradeço aos rumos que a vida toma que me fizeram ter a sorte de encontrar o Fellipe Souto e de hoje tê-lo como meu companheiro. Obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma, por me incentivar todos os dias e por todo o apoio incondicional nesses dois anos.

A todas as pessoas que não foram citadas mas de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do meu mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, meu agradecimento e mais sincero respeito a todos os animais que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

RESUMO

Pereira, Nayara. **Leucotrienos no Diabetes tipo 1: Ativação de um fenótipo imunometabólico distinto em macrófagos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O diabetes tipo 1 (DT1) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, hipoinsulinemia e dislipidemia. Esse desbalanço de nutrientes leva a inflamação sistêmica conhecida como *meta-inflammation* e a comorbidades ligadas ao DT1. Leucotrienos são mediadores lipídicos que contribuem para o estabelecimento da inflamação sistêmica no DT1 e afetam o fenótipo inflamatório de macrófagos nessa condição. Além disso, leucotrienos contribuem para o aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial em macrófagos através de seu efeito na da proteína desacopladora UCP1. Entretanto, quais vias metabólicas, qual o papel destas e como elas afetam a função dos macrófagos no DT1 nunca tinha sido estudado. Neste trabalho mostramos que a via de oxidação de ácidos graxos dependente de leucotrienos e associada a atividade da proteína desacopladora UCP1 são fatores importantes para a ativação de macrófagos peritoneais no DT1. Mostramos que leucotrienos contribuem para um fenótipo pró-inflamatório porém com traços de fenótipo de reparo e que essas células possuem metabolismo oxidativo elevado associado a alta expressão da proteína desacopladora UCP1. A produção de citocinas IL-12, IL-1 β e IL-10, elevada em macrófagos diabéticos de maneira dependente de leucotrienos, caiu drasticamente após o bloqueio da oxidação de ácidos graxos pela droga Etomoxir, indicando o papel importante dessa via na ativação de macrófagos. Como evidência disto, ensaios *in vitro* mostraram que a expressão proteica de UCP1 em macrófagos aumenta de maneira dependente de leucotrienos quando essas células são colocadas em meio condicionado derivado de lipólise. Por fim, mostramos que leucotrienos contribuem para a *meta-inflammation* induzindo a inflamação no tecido adiposo epididimal, intensificando a perda de adiposidade de animais diabéticos. Nossos resultados indicam uma papel importante dos leucotrienos na ativação e na condição imunometabólica de macrófagos peritoneais além de contribuir para o estabelecimento da inflamação sistêmica no DT1.

Palavras-chave: *meta-inflammation*, UCP1, oxidação de ácidos graxos,

ABSTRACT

Pereira, Nayara. **Leukotrienes in diabetes type 1: Activation of a distinct immunometabolic phenotype in macrophages**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Type 1 diabetes (T1D) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia, hypoinsulinemia and dyslipidemia. This imbalance of nutrients leads to systemic inflammation known as meta-inflammation and comorbidities linked to DT1. Leukotrienes are lipid mediators shown to contribute to the establishment of systemic inflammation in DT1 and also to the inflammatory phenotype in macrophages in this condition. In addition, leukotrienes contribute to the increase in mitochondrial oxidative metabolism in macrophages in an uncoupling protein UCP1-associated manner. However, which metabolic pathways and their role for the function of macrophages in DT1 had never been studied. Herein, we showed that the fatty acid oxidation path associated with the activity of the uncoupling protein UCP1 is important for the activation of peritoneal macrophages in DT1. We have shown that leukotrienes contribute to pro-inflammatory phenotype but with traces of reparative phenotype and these cells have high oxidative metabolism associated with high expression of the UCP1 uncoupling protein. The production of cytokines IL-12, IL-1 β and IL-10 elevated in diabetic macrophages in a leukotriene-dependent manner, came down dramatically after blocking fatty acid oxidation by the drug Etomoxir, indicating the important role of this pathway in the activation of macrophages. As evidence of this, in vitro assays have shown that UCP1 protein expression in macrophages increases in a leukotriene-dependent manner when these cells are placed in conditioned medium derived from lipolysis. Finally, we show that leukotrienes contribute to metaflammation by inducing inflammation in the epididimal adipose tissue, intensifying the loss of adiposity in diabetic animals. Our results indicate an important role of leukotrienes in the activation and immunometabolic condition of peritoneal macrophages in addition to the establishment of systemic inflammation of DT1

Keywords: meta-inflammation; Ucp1, fatty acids oxidation,

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos primers mouse.....	38
Tabela 2. Descrição e valores de expressão gênica e Fold change dos genes presentes nos HeatMap da figura 9.	57
Tabela 3. Descrição e valores de expressão gênica e Fold change dos genes presentes nos HeatMap da figura 13.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de produção de leucotrienos a partir do ácido araquidônico.....	22
Figura 2. Receptores BLT e CysLT, e seus ligantes.	23
Figura 3. Estratégia de gate para fenótipo de células peritoneais.....	37
Figura 4. Figura esquemática do cálculo de parâmetros no ensaio Mito stress (Seahorse – Agilent).	41
Figura 5. Estratégia de gate para MitoSOX.....	44
Figura 6. Composição celular e produção de IL-12 no peritônio de camundongos saudáveis e diabéticos.	50
Figura 7. Esquema de gates na citometria da composição celular do peritônio de camundongos saudáveis e diabéticos, WT e 5LO ^{-/-}	51
Figura 8. Citocinas e expressão gênica de marcadores de ativação de macrófagos peritoneais de animais saudáveis e diabéticos..	53
Figura 9. Heatmap de genes ligados a Sensibilidade aos níveis de nutrientes (A), Catabolismo de carboidratos (B), resposta a ácidos graxos (C), Biossíntese de ácidos graxos(D) e Proteínas na membrana interna mitocondrial (E) em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos.	56
Figura 10. Expressão gênica de Ucp1 em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos..	58
Figura 11. Respiração mitocondrial de macrófagos e camundongos saudáveis e diabéticos.	60
Figura 12. Expressão gênica de Ucp1 em animais diabéticos e saudáveis diante do tratamento com Etomoxir.	61
Figura 13. Heatmap de Resposta ao Estresse Oxidativo (A), a produção de EROs mitocondrial (B) e Expressão gênica de Gpx1(C) em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos. (A)	63
Figura 14. Produção de IL1 β , IL-12 e IL-10 e expressão gênica Nos2 e Arg1 por macrófagos de animais saudáveis e diabéticos e frente ao tratamento com Etomoxir. .	66
Figura 15. Padronização de ensaio de Lipólise (A) e Expressão proteica de UCP1 em BMDM (B) e macrófagos peritoneais (MOP) (C) de animais saudáveis.....	68

Figura 16. Produção de IL-12, TNF- α , IL-6 e MCP-1 pelo tecido adiposo epididimal(A-D) e subcutâneo(E e F) de animais saudáveis e diabéticos.	70
Figura 17. Perda de tecido epididimal (A) e histologia do tecido adiposo epididimal (B e C) de animais saudáveis e diabéticos.	72
Figura 18. Ganho de Massa Corporal(A) e Consumo de alimento(B) de camundongos saudáveis e diabéticos..	74
Figura 19. Esquematização dos principais achados descritos nesse trabalho.....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-LO – 5-lipoxigenase

AA – ácido araquidônico

Arg1 – gene de arginase

ATP – trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*)

BLT (LTB₄R) – receptor de leucotrieno B₄ (*leukotriene B₄ receptor*)

BMDM – Macrófagos derivados de medula óssea (*Bone marrow-derived macrophages*)

cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)

cPLA₂ – Fos folipase A2 citosólica (*Cytosolic Phospholipase A2*)

Chi3l3 - proteína 3 semelhante a quitinase 3 (*chitinase 3 like 3*)

CPT1a - carnitina palmitoil transferase 1A (*carnitine palmitoyl transferase 1 alpha*)

CTE – Cadeira de Transporte de elétrons

cysLTs - cisteinil leucotrienos (*cysteinil leukotrienes*)

DT1 – diabetes tipo 1

ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EROs – Espécies reativas de Oxigênio

FADH₂ - dinucleotido de dihidroflavina e adenina (*dihydroflavine-adenine dinucleotide*)

FAO – Oxidação de ácidos graxos (*Fatty acids Oxidation*)

FAS – ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*)

FLAP – proteína ativadora da 5-lipoxigenase (*5-lipoxygenase-activating protein*)

FSC - forward scatter

FSC-H - forward scatter height

Hprt – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

IDLs – lipoproteína de densidade intermediária (*intermediate-density lipoprotein*)

IFN γ – interferon gamma IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível (*inducible nitric oxide synthase*)

KO – *knockout*

LDL - lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein*)

LPS – lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide*)

LT – leucotrieno

LTA4 – leucotrieno A4

LTB4 – leucotrieno B4

LTC4 – leucotrieno C4

LTD4 – leucotrieno D4

LTE4 – leucotrieno E4

NADH - dinucleotido de nicotinamida e adenina reduzido (*deduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

PCRq ou RT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa (*polimerase chain reaction quantitative*)

PPP – via da pentose fosfato (*pentose phosphate pathway*)

RIPA – ensaio de radioimunoprecipitação (*radioimmunoprecipitation assay*)

SDS-PAGE - dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*)

SEM – erro padrão da média (*standard error of the mean*)

SOCS – supressora da sinalização de citocinas (*suppressor of cytokine signaling*)

SSC – side scatter

STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição (*Signal transducer and activator of transcription*)

STZ - estreptozotocina (*streptozotocin*)

TAG – Triacilglicerol

TCA – ciclo do ácido tri carboxílico (*tricarboxylic acid cycle*)

Th – linfócito T auxiliar (*T helper lymphocyte*)

TLR – receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*)

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrose factor alpha*)

UCP1 – Proteína desacopladora 1 (*Uncoupling protein 1*)

VLDL - lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density*)

WT – Animais selvagens, sem transgenia (*Wild type*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1.O diabetes tipo 1	21
1.2.Biossíntese e atividade de leucotrienos	22
1.3.Leucotrienos no diabetes	24
1.4.Polarização de macrófagos.....	25
1.5.Metabolismo energético de macrófagos	28
1.6.Metabolismo lipídico sistêmico e as alterações no DT1	30
1.7.Modelo de hiperglicemia induzida por estreptozotocina.....	32
2. OBJETIVO.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1.Animais	35
3.2.Protocolo de Indução a hiperglicemia do Diabetes tipo 1	35
3.3.Coleta de macrófagos peritoneais.....	35
3.4.Citometria para caracterização do fenótipo das células peritoneais	36
3.5.Análise da expressão gênica	38
3.6.Análise dos dados do RNAseq de macrófagos	38
3.7.Análise de Enriquecimento dos genes do RNAseq.....	39
3.8.Ensaio de Taxa de consumo de Oxigênio (MitoStress - Seahorse)	39
3.9.Inibição da via de oxidação de ácidos graxos	42
3.10.Dosagem de citocinas.....	42
3.11.Ensaio de viabilidade celular – MTT	42
3.12.Quantificação de Espécies reativas de Oxigênio mitocondriais (MitoSOX) ..	43
3.13.Cultura de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.....	45
3.14.Ensaio de padronização de lipólise em 3T3-L1.....	45
3.15.Coleta e diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea(BMDM) ..	45
3.16.Estimulo de macrófagos com meio condicionado derivado de lipólise.....	46
3.17.Western Blot	46
3.18.Histologia do tecido adiposo	46
3.19.Quantificação do tamanho dos adipócitos.....	47
3.20.Avaliação do ganho de massa corporal e consumo de ração.....	47

3.21 Análise estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1.No diabetes, leucotrienos estão envolvidos na migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal e na diferenciação de macrófagos	48
4.2.Leucotrienos intensificam o metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneais de animais diabéticos	54
4.3.A via de oxidação de ácidos graxos tem papel importante na produção de citocinas em macrófagos de animais diabéticos	61
4.4.Metabólitos da lipólise induzem a expressão proteica de UCP1 em macrófagos de maneira dependente de LTB4.....	67
4.5.Leucotrienos induzem inflamação no tecido adiposo epididimal de animais diabéticos	69
5.DISSCUSSÃO	76
6.CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE	90
Artigos publicados durante o mestrado.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. O diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 (DT1) é uma doença autoimune em que células auto reativas e anticorpos respondem contra as células β -pancreáticas produtoras de insulina, destruindo-as e diretamente impactando a produção desse hormônio (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; GILLESPIE, 2006). A produção de insulina deficiente e conseqüente hiperglicemia causam alterações relevantes no metabolismo sistêmico, classificando essa condição também como uma doença metabólica (PIERO, 2015).

A incidência de diabetes tem crescido cada vez mais e o diabetes tipo 1 é responsável por cerca de 5 a 10% dos casos de diabetes do mundo (MAAHS et al., 2010). Ainda que pouco prevalente, o DT1 vem aumentando cerca de 3% ao ano, acometendo principalmente crianças e jovens (CATALOGUING, 2016). Isto chama atenção para a necessidade de mais estudos sobre as comorbidades que acompanham o desenvolvimento dessa doença.

Um exemplo de comorbidade é a grande perda de tecido adiposo em decorrência da baixa quantidade ou completa ausência de insulina, provocando o acúmulo de lipídeos no sangue (ROSENFALCK et al., 2002; WILLECKE et al., 2015). O desbalanço nos níveis de nutrientes sistêmicos leva ao estresse metabólico celular contribuindo para inflamação sistêmica, fenômeno conhecido como *meta-inflammation* (ERTUNC; HOTAMISLIGIL, 2016; HOTAMISLIGIL, 2017).

Meta-inflammation é resultado de um ciclo vicioso entre o excesso de nutrientes e o estímulo ao estado inflamatório em doenças metabólicas (KURYŁOWICZ; KÓZNIEWSKI, 2020). Células em estresse metabólico contribuem para a inflamação sistêmica produzindo mediadores inflamatórios, que por sua vez podem induzir resistência à insulina em tecidos chave para o controle metabólico, como o tecido adiposo (CAPUTO; GILARDI; DESVERGNE, 2017).

Estudos de nosso grupo demonstraram que leucotrienos são mediadores inflamatórios importantes no estabelecimento da inflamação sistêmica no DT1 (FILGUEIRAS et al., 2015a; SEREZANI et al., 2011). O Leucotrieno B4 (LTB4), principalmente, promove e mantém o estado de inflamação sistêmica, bem como induz diretamente um perfil pró-inflamatório em macrófagos no DT1 (FILGUEIRAS et

al., 2015a; RAMALHO et al., 2018; SEREZANI et al., 2011).

1.2. Biossíntese e atividade de leucotrienos

Os leucotrienos são mediadores lipídicos derivados ácido araquidônico (AA) presente em membranas celulares. A produção desse mediador se inicia em um contexto de ativação celular, em que a enzima fosfolipase A2 (cPLA2) ativa o AA esterificado da membrana o torna disponível para ser hidrolisado. A hidrólise do AA é realizada pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO) em conjunto com a proteína ativadora da 5LO (FLAP), que embora não tenha propriedades enzimáticas aumenta a atividade da 5LO frente ao substrato (FOLCO; MURPHY, 2006; PETERS-GOLDEN; BROCK, 2003).

O primeiro produto da reação de hidrólise do AA é o Leucotrieno A₄ (LTA₄), que pode ser rapidamente convertido em LTB₄ pela enzima LTA₄ hidrolase ou conjugado a uma glutatona formando Leucotrieno C₄ (LTC₄), através da LTC₄ sintase (FOLCO; MURPHY, 2006) (Figura 1).

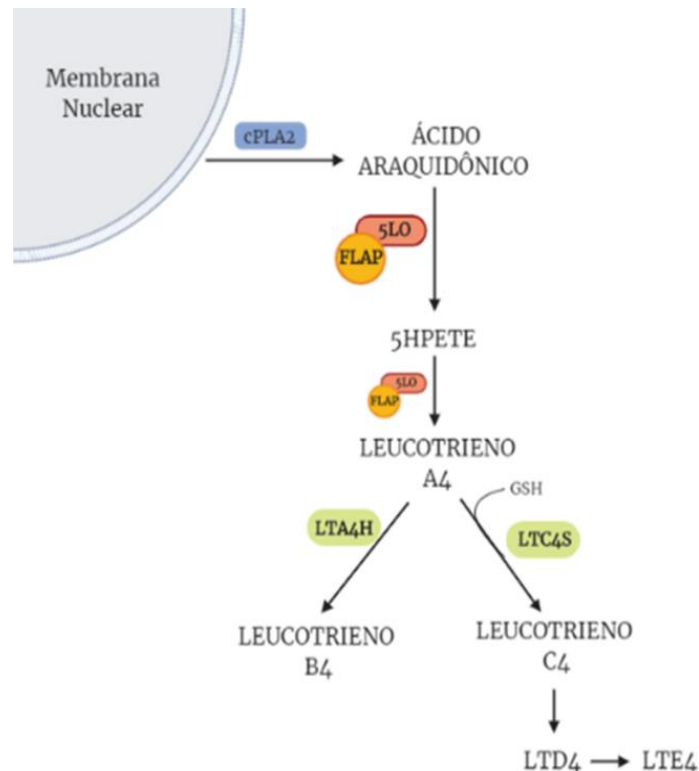


Figura 1. Via de produção de leucotrienos a partir do ácido araquidônico. cPLA2: Fosfolipase A2, 5LO: 5-Lipoxigenase, FLAP: proteína ativadora da 5-LO, LTA₄H: hidrolase de Leucotrieno A₄, LTC₄S: sintase do leucotrieno C₄, GSH: glutatona.

LTC₄, o primeiro representante da classe dos cistenil leucotrienos (CysLTs), é convertido posteriormente em LTD₄ e então em LTE₄, por sucessivas hidrólises do aminoácido cisteína (FOLCO; MURPHY, 2006; PETERS-GOLDEN et al., 2005). As atividades biológicas desses mediadores se dão pela interação com receptores específicos acoplados a proteína G (KANAOKA; BOYCE, 2004). O LTB₄ interage com os receptores BLT1 ou BLT2, sendo BLT1 o receptor de maior afinidade, enquanto os cistenil leucotrienos interagem com receptores CysLT1, CysLT2 ou GPR99 (LTE₄) (KANAOKA; BOYCE, 2004; TAGER; LUSTER, 2003) (Figura 2).

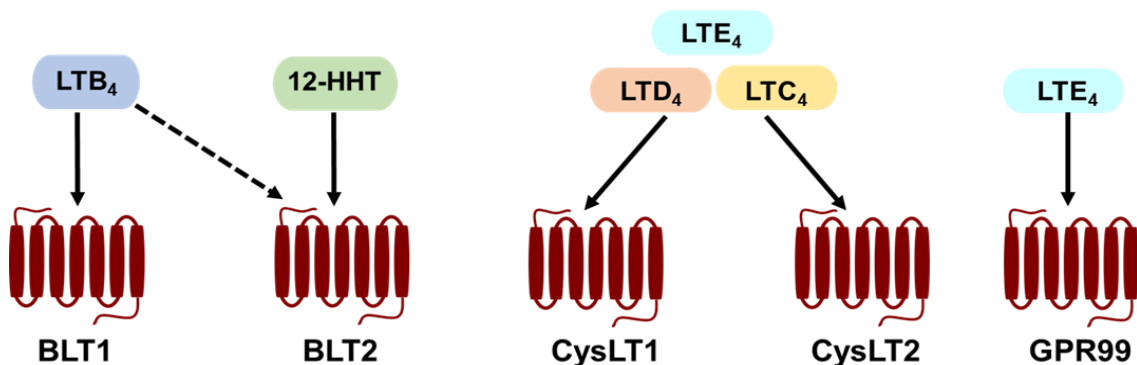


Figura 2. Receptores BLT e CysLT, e seus ligantes. BLT1 e BLT2 são receptores para LTB₄, embora BLT1 seja o receptor de maior afinidade. CysLT1 e CysLT2 são receptores para LTC₄ e LTD₄. LTE₄ tem afinidade maior pelo receptor GPR99. Imagem adaptada de Ramalho T., Pereira N., Brandt S.L., Serezani C.H. (2020) Targeting Leukotrienes as a Therapeutic Strategy to Prevent Comorbidities Associated with Metabolic Stress.

Os receptores CysLT1,2 sinalizam via Gq, que aumenta a captação de Ca²⁺ intracelular, culminando na ativação de cascatas de quinases, as quais levam a alterações celulares e ativação de fatores de transcrição (PETERS-GOLDEN et al., 2005). Já os receptores BLT1/2 podem atuar tanto via proteínas Gi quanto Gq. Na via de acoplamento de Gq, ocorre a ativação de proteínas quinases C e PLCβ, que induzem o acúmulo de IP3 (1,4,5 trifosfato de inositol) e consequentemente estimulam as funções microbicidas nas células imunes. Já na via de Gi, a ligação do LTB₄ ao BLT1 estimula o bloqueio de adenilato ciclase, diminuindo as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (PERES et al., 2007; PETERS-GOLDEN et al., 2005; SAEKI; YOKOMIZO, 2017). Essa via é importante para a ativação de macrófagos via *Toll-like receptors* (TLRs) que usam MyD88 como proteína adaptadora (PERES et al., 2007; TAGER; LUSTER, 2003). Além disso, a ativação de BLT1 estimula a degradação de SOCS1, proteína responsável por inibir

STAT1 e controlar negativamente MyD88. Isso estimula a ativação de TLRs dependentes de MyD88 e consequentemente a ativação de NFkB, potencializando a produção de citocinas inflamatórias (SEREZANI et al., 2011)

O LTB4 é conhecido pela sua atividade em processos inflamatórios, induzindo quimiotaxia, produção de citocinas, estímulo a fagocitose e atividade microbicida, ao passo que os cistenil-leucotrienos estão relacionados a outros processos fisiológicos como bronco constrição, secreção de muco e edema, estando bastante presentes em respostas alérgicas e anafilaxia (PETERS-GOLDEN et al., 2005). Por possuir essa característica de potencializar a resposta inflamatória, o LTB4 está presente nas doenças metabólicas, principalmente naquelas em que a inflamação sistêmica é central para o desenvolvimento de comorbidades (FILGUEIRAS et al., 2015b; LI et al., 2015).

1.3. Leucotrienos no diabetes

Em camundongos com diabetes tipo 2 (DT2) induzida por dieta hiper lipídica, o LTB4 é importante para o desenvolvimento da resistência à insulina (LI et al., 2015). Tecido adiposo, músculo e hepatócitos desses animais apresentam elevados níveis de LTB4. O aumento desse mediador no tecido adiposo induz maior produção de citocinas pró-inflamatórias além de aumentar a migração de macrófagos inflamatórios para o tecido(LI et al., 2015).

Nos hepatócitos e músculo de animais com DT2, a captação de glicose por insulina é prejudicada pela ativação do BLT1. Isso acontece porque a ativação do BLT1 amplifica a resposta inflamatória que inibe a expressão de componentes da via de sinalização da insulina (SPITE et al., 2011). Fato semelhante foi observado no contexto de DT1, em que animais 5LO^{-/-} apresentam maior sensibilidade à insulina no músculo, caracterizado pelo aumento da expressão do receptor de insulina e fosforilação de *Akt* (GUIMARÃES et al., 2019).

Esses estudos são importantes para compreensão do papel do LTB4 como importante indutor de inflamação sistêmica em doenças metabólicas, uma vez que tanto a inibição genética quanto farmacológica desse mediador nestes estudos levaram a bons resultados no controle da hiperglicemia e da inflamação sistêmica (LI et al., 2015; SPITE et al., 2011).

O papel do LTB4 no diabetes é central não apenas no estabelecimento da resistência à insulina em função da promoção da inflamação sistêmica, mas também no desenvolvimento de comorbidades que são bastante frequentes no DT2. Recentemente foi descrito que indivíduos DT2 que desenvolveram neuropatia cardiovascular autonômica (NCA), apresentaram níveis de LTB4 no plasma mais altos comparados a indivíduos com DT2 que não desenvolvem esta comorbidade (NEVES et al., 2020).

Também foi descrito em mulheres DT2 com NCA que existe correlação entre os níveis de LTB4 o índice de acúmulo de lipídios (NEVES et al., 2020). Em um outro estudo, os elevados níveis de LTB4 em indivíduos com DT1 também foram correlacionados com a insuficiência do controle glicêmico e com o desenvolvimento de neuropatia autonômica cardiovascular (SANTOS-BEZERRA et al., 2020).

Sabe-se que a inflamação sistêmica associada a doenças metabólicas aumenta a susceptibilidade dos indivíduos a infecções oportunistas (CODO et al., 2020). Associado a isto, a alta susceptibilidade a sepse no DT1 também tem relação com a inflamação sistêmica induzida pelo LTB4 (FILGUEIRAS et al., 2015a). Nosso grupo demonstrou que a correção na produção de leucotrienos, ou a menor ativação de BLT1 leva a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e de MyD88, aumentando a sobrevivência dos animais diabéticos a sepse poli microbial.

Trabalhos do nosso grupo também mostraram que altos níveis de LTB4 circulantes no DT1 se correlacionam diretamente com a cicatrização prejudicada em indivíduos diabéticos (RAMALHO et al., 2018). Os leucotrienos induzem um fenótipo inflamatório em monócitos e induzem alta expressão de genes inflamatórios como *Stat1*, *Nos2*, *Il122* e *Il1b* em macrófagos peritoneais. Além disso, no processo de cicatrização em camundongos diabéticos, a repolarização desses macrófagos inflamatórios para um fenótipo de reparo é dificultada pela presença de leucotrienos (RAMALHO et al., 2018).

1.4. Polarização de macrófagos

Nas últimas décadas, os macrófagos começaram a ser descritos como células multifuncionais que são responsáveis por funções tanto na defesa do hospedeiro quanto no reparo de tecidos, controle da homeostasia e no desenvolvimento de patologias (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008). Essas células

estão presentes potencialmente em todos os tecidos do corpo, porém, podem possuir diferentes origens (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

Macrófagos podem se diferenciar de monócitos circulantes, oriundos de células mieloides progenitoras da medula óssea, que migram para o tecido em condições de inflamação ou são recrutadas para substituir macrófagos teciduais residentes (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Já macrófagos residentes como osteoclastos, macrófagos alveolares, células de Kupffer no fígado, macrófagos peritoneais, entre outros, têm sua formação inicial em órgãos hematopoiéticos embrionários (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; GORDON; TAYLOR, 2005).

Para que os macrófagos sejam capazes de desempenhar tantas funções, essas células imunes adotaram uma distinta capacidade de possuir diversos estados de ativação (MURRAY et al., 2014). Dentro do espectro de ativação que um macrófago pode possuir, três subtipos foram classificados como principais baseados no tipo de ativação, sendo: macrófagos classicamente ativados, alternativamente ativados e regulatórios (MOSSER; EDWARDS, 2008).

A ativação clássica de macrófagos se dá através de estímulos inflamatórios como LPS, IFN- γ e de linfócitos Th1 e células NK, além de TNF α de células dendríticas. Macrófagos classicamente ativados são conhecidos por fenótipo M1 ou M(LPS)/M(LPS+INF- γ) e apresentam maior expressão de marcadores inflamatórios como STAT1 e iNOS, produção elevada de citocina IL-12 e reduzida produção de IL-10 (MURRAY, 2017; MURRAY et al., 2014).

Do outro lado, estão os macrófagos conhecidos como macrófagos regulatórios. A ativação desses macrófagos se dá por IL-10, células apoptóticas, imunocomplexos, glicocorticoides, prostaglandinas entre outros, o fenótipo se caracteriza pela alta produção de IL-10 que diminui a produção de IL-12, sendo a proporção entre essas duas citocinas uma característica usada para definir macrófagos reguladores (FADOK et al., 1998; STERNBERG, 2006).

Em meio a esse espectro de ativação dos macrófagos está a ativação alternativa, que acontece via estímulo de citocinas como IL-4 e IL-13 produzidas por linfócitos Th2, mastócitos e células linfoides inatas e induzem a expressão de moléculas relacionadas a reparo tecidual como Chil3l3, Arg1, STAT6 e baixa ou nenhuma produção de IL-12. Este estado de ativação alternativa, denominado por M(IL-4)/M(IL-13) caracterizam o fenótipo M2 juntamente com os macrófagos regulatórios, anteriormente mencionados (FLEMING; MOSSER, 2011; MOSSER;

EDWARDS, 2008).

No contexto de doenças metabólicas, os macrófagos podem apresentar fenótipos diferentes daqueles classicamente estabelecidos. Em camundongo diabéticos tipo 1, macrófagos peritoneais apresentaram maior expressão gênica de marcadores inflamatórios como STAT1, NOS2, IL-12, mostrando forte inclinação para um perfil inflamatório, porém a expressão gênica de IL-10 se encontrou bastante alta, indicando transição entre os fenótipos (RAMALHO et al., 2018).

Diversos outros estudos em contextos de doenças metabólicas também já demonstraram fenótipos distintos em macrófagos. Nestes estudos, é bastante comum observar os macrófagos expressando simultaneamente marcadores associados aos fenótipos anti- e pro-inflamatório, bem como o metabolismo dessas células varia de acordo com o microambiente com o qual estas células interagem *in vivo* (YANG; BOSSCHE; RAMALHO, 2020).

O estado de ativação de macrófagos pode sofrer influência do metabolismo celular (VIOLA et al., 2019), um exemplo disso está no metabolismo de aminoácidos. A arginina é um aminoácido essencial para a produção de óxido nítrico em macrófagos inflamatórios e promoção do papel antimicrobiano nessa célula (MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998) ao passo que em macrófagos de reparo, a arginina é transformada pela arginase em ornitina, essencial para a produção de colágeno (CORRALIZA et al., 1994). Ambas as funções demonstradas são primárias dos macrófagos e dependem de um substrato em comum.

Nos últimos anos, o vasto espectro dos diferentes status de ativação dos macrófagos tem sido diretamente relacionado ao estado metabólico da célula (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Porém a classificação didática simplificada de macrófagos M1 e M2 (classicamente e alternativamente ativados) pouco se aplica na descrição do status metabólico e funcional em estudos *in vivo*. Nesses estudos, a resposta metabólica de macrófagos a diversos estímulos varia de acordo com o microambiente em que o macrófago se encontra, muitas vezes não se encaixando entre os dois extremos de M1 e M2.

1.5. Metabolismo energético de macrófagos

A reprogramação metabólica de macrófagos tem um papel importante tanto na regulação do fenótipo dessas células quanto a plasticidade fenotípica. Alguns autores têm descrito que existe um *shift* metabólico responsável pela alteração do fenótipo do macrófago e que a função da célula está diretamente relacionada a via metabólica predominante naquele fenótipo (MATHIS; SHOELSON, 2011; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; PEARCE; PEARCE, 2018).

Nestes trabalhos, macrófagos comumente chamados de fenótipo M1, classificados como M(LPS) e/ou M(LPS+IFN- γ), são caracterizados por possuírem metabolismo glicólico predominante (MILLS et al., 2016). Trabalhos com a utilização de 2DG (2-deoxi-glicose), molécula similar a glicose que é captada pelo GLUT1 porém incapaz de ser metabolizada pela via glicolítica, mostraram que várias características do fenótipo M(LPS)/ M(LPS+INF- γ), como a produção de citocinas inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio(ROS) foram bloqueadas com o tratamento (MICHL; OHLBAUM; SILVERSTEIN, 1976; PAVLOU et al., 2017).

Isto se dá, pois, a via glicolítica é descrita como importante fornecedora de substratos necessários para produção de moléculas microbidas e sinalizadoras. Por exemplo, a via das pentoses fosfato (PPP) tem como substrato principal a glicose-6-fosfato oriunda do metabolismo da glicose pela hexoquinase (HK), essa via suporta as respostas inflamatórias de macrófagos gerando aminoácidos para síntese de proteínas, ribose para nucleotídeos e NADPH para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela NADPH oxidase (BAARDMAN et al., 2018; NAGY; HASCHEMI, 2015).

O piruvato gerado na glicólise alimenta o ciclo ácido tricarboxílico (TCA), que possui duas “quebras”, ou desvios de rota, em macrófagos M(LPS)/ M(LPS+INF- γ) (JHA et al., 2015; O'NEILL, 2015). A primeira quebra ocorre no metabolismo de citrato que normalmente é convertido em α -cetoglutarato pela enzima isocitrato desidrogenase (IDH1). Nesses macrófagos, a baixa regulação de IDH1 e o aumento da expressão da enzima imuno-responsiva gene 1 (IRG1) levam a produção de itaconato, uma molécula microbida (MICHELUCCI et al., 2013). A produção de itaconato pode contribuir para a segunda quebra no TCA, que ocorre logo após a produção de succinato, já que essa molécula inibe competitivamente a ação da enzima succinato desidrogenase(SDH) (CORDES et al., 2016). Essas duas quebras

têm ações diretas na função do macrófago M(LPS)/ M(LPS+INF- γ) (TANNAHILL et al., 2013).

Por outro lado, um TCA intacto e uma atividade potencializada da oxidação fosforilativa (OXPHOS) têm sido descritos como vias relevantes para o fenótipo de macrófagos M(IL-4) (VAN DEN BOSSCHE; BAARDMAN; DE WINTHER, 2015). Esse fato não exclui o aumento da glicólise nesses macrófagos, porém o que distingue M(IL-4) daqueles M(LPS)/ M(LPS+INF- γ) é o não direcionamento de substratos para a PPP nesse fenótipo (HASCHEMI et al., 2012).

Já a via de oxidação de ácidos graxos (FAO) originalmente era vista como a via de suporte para o estabelecimento de macrófagos anti-inflamatórios (NAMGALADZE; BRÜNE, 2016). Entretanto, atualmente sabe-se que a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é dispensável para a polarização de M(IL-4) e que a glicólise é importante para suprir o TCA e, portanto, dar suporte para o funcionamento de OXPHOS em macrófagos alternativamente ativados (DIVAKARUNI et al., 2018). Além disso, trabalhos mostraram que a IL-4 pode sinalizar via Akt e mTORC1, aumentando o metabolismo de glicose (COVARRUBIAS et al., 2016; HUANG et al., 2016; VAN DEN BOSSCHE et al., 2016).

É descrito que o metabolismo glicolítico é a fonte de ATP em macrófagos pró-inflamatórios, e dessa forma, a cadeia de transporte de elétrons (CTE) dessas células teria uma função de produção de EROS para a defesa contra infecções (DISKIN; PÅLSSON-MCDERMOTT, 2018). Assim, o estímulo pró-inflamatório induz em macrófagos a hiperpolarização mitocondrial e o fluxo reverso de elétrons na CTE desestabilizando o supercomplexo mitocondrial e induzindo, portanto, a alta produção de espécies reativas (SCIALÒ et al., 2016).

Por outro lado, o fluxo de elétrons em macrófagos anti-inflamatórios é direto, o que diminui a produção de EROS e promove uma produção de ATP mais constante. Assim sendo, a IL-4 pode regular positivamente a OXPHOS via ativação de STAT6 e do coativador de PPAR- γ -1b (PGC-1 α), sendo esse último estimulador da biogênese mitocondrial e responsável pela diminuição de citocinas pro-inflamatórias quando super expresso (VATS et al., 2006). Neste contexto, a IL-10 também pode estimular a atividade estável da OXPHOS diminuindo a produção de EROs, além de suprimir a captação de glicose (DISKIN; PÅLSSON-MCDERMOTT, 2018; IP et al., 2017).

A oxidação de ácidos graxos (do inglês *fatty acid oxidation*, FAO) é uma atividade mitocondrial que foi bastante relacionada a macrófagos anti-inflamatórios,

embora o real papel dessa via nas funções dessas células ainda não seja claro (VAN DEN BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017). Os macrófagos são capazes de captar lipoproteínas de baixa (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL) além de lipoproteínas oxidadas circulantes através de processos de macropinocitose, fagocitose e por diferentes receptores, dentre eles, os do tipo Scavenger, como o CD36 (TABAS; BORNFELDT, 2016).

O metabolismo lipídico em macrófagos tem início nos lisossomos, e quando livres, os produtos desse metabolismo são direcionados para a mitocôndria para o processo de beta-oxidação (REMMERIE; SCOTT, 2018). Os produtos de lipídios metabolizados nos lisossomos podem ser dispensados pelos macrófagos por receptores cujos fatores de transcrição têm sido associados à ativação de vias anti-inflamatórias (THOMAS et al., 2018).

Além disso, o metabolismo de ácidos graxos na mitocôndria pode produzir grande quantidade de EROs (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008). Uma forma de controle mitocondrial para diminuir a produção de EROs é a ativação de proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins*), conhecidas como UCPs que aumentam a permeabilidade de prótons para dentro da membrana interna mitocondrial e assim estimulando maior consumo de oxigênio, diminuindo o potencial de membrana e diminuindo o estresse oxidativo (NICHOLLS, 2006; SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008; SLUSE et al., 2006).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que o LTB₄ contribuiu para o aumento da atividade mitocondrial de macrófagos peritoneais de camundongos diabéticos do tipo 1. Nesse trabalho, foi visto no contexto de hiperlipidemia, que os macrófagos apresentam alta captação e acúmulo de ácidos graxos, além de aumentarem a glicólise e o metabolismo oxidativo de forma dependente de UCP1. Todos esses parâmetros foram pelo menos parcialmente revertidos com o inibidor do BLT1, receptor de alta afinidade do LTB₄ (RAMALHO et al., 2019).

1.6. Metabolismo lipídico sistêmico e as alterações no DT1

No processo de digestão, os lipídios da dieta são emulsificados pelos sais biliares formando micelas mistas que sofrerão ação das lipases pancreáticas. As lipases hidrolisam os ácidos graxos de maneira que esses podem ser absorvidos pela mucosa intestinal, convertidos em triacilgliceróis (TAG) e empacotado em estruturas

chamadas quilomícrons (REMMERIE; SCOTT, 2018; VERGÈS, 2009).

Os quilomícrons migram para os tecidos por meio do sistema linfático e da corrente sanguínea. Quando em capilares próximos ao tecido adiposo ou muscular, a lipoproteína lipase é ativada pela apolipoproteína-C II (apoC-II), presente na superfície dos quilomícrons, e libera ácidos graxos e glicerol que entrarão nas células e serão utilizados como combustível ou serão reesterificados para armazenamento (NORDESTGAARD et al., 2010).

De acordo com a necessidade energética do corpo, os TAG armazenados no tecido adiposo podem ser mobilizados e distribuídos para os demais tecidos em um processo chamado lipólise. Baixos níveis de glicose no sangue estimulam a secreção de hormônios como glucagon e epinefrina, esse processo ativa a lipase hormônio sensível (HSL) que libera os ácidos graxos para serem distribuídos pelos tecidos através do transporte pela albumina sérica. Esses ácidos graxos entram no fígado e podem ser oxidados para geração de energia ou convertidos em corpos cetônicos (HARWOOD, 1988).

O fígado é responsável por receber os quilomícrons remanescentes da dieta que nesse órgão são degradados em ácidos graxos e colesterol, associados a apolipoproteínas e novamente colocados na circulação sob a forma de lipoproteínas de densidade muito leve (VLDL) (WILLNOW et al., 1994). As VLDL são metabolizadas pelas lipases lipoproteicas nos tecidos sendo transformadas em lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e por fim lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que retornam para o fígado. Em uma via conhecida como transporte reverso do colesterol, lipoproteínas de alta densidade (HDL) são liberadas do fígado com a finalidade de captar colesterol remanescente das células, retornando para o fígado para que seja metabolizado (VERGÈS, 2009).

Embora haja grande perda de tecido adiposo somado a altos níveis de lipídeos circulantes na condição de diabetes tipo 1, o fígado de camundongos diabéticos se mostrou livre de esteatoses e com baixa expressão proteica de marcadores relacionadas a lipogênese como FAS e SREBP de maneira dependente de LTB4 (RAMALHO et al., 2019). Nesse caso, os lipídeos no fígado podem ser utilizados para a produção de corpos cetônicos que auxiliam no controle da demanda energética do corpo na condição de diabetes (WILLECKE et al., 2015).

A insulina tem um papel central na regulação do metabolismo lipídico pois promove estímulos a lipogênese reduzindo a concentração de ácidos graxos livres na

circulação (SAMUEL; PETERSEN; SHULMAN, 2010). Esse hormônio é um potente ativador da enzima lipase lipoproteica, promovendo o catabolismo de lipoproteínas ricas em TAG e reduzindo os níveis de VLDL na circulação (LEWIS et al., 1993). Além disso, a insulina também aumenta a eliminação de LDL pelo aumento da atividade de receptores B e E de LDL no fígado e ainda estimula a captação de colesterol pelas HDL ativando a enzima Lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e as atividades da lipase hepática (CHAIT et al., 1979).

Pacientes diabéticos tipo 1 com cetoacidose apresentam alterações significativas na quantidade de lipídeos circulantes devido a deficiência de insulina. Nesse estado, a atividade da enzima lipase lipoproteica é muito reduzida e os níveis de catabolismo de VLDL diminuem drasticamente, levando a um quadro sério de hipertrigliceridemia (CHAIT et al., 1979; DULLAART, 1995). Embora o tratamento com insulina seja o mais preconizado para a regulação da glicemia, diminuição da hiperlipidemia e controle da cetoacidose, humanos com DT1 controlada ainda apresentam metabolismo lipídico desequilibrado (WILLECKE et al., 2015).

Diversas doenças metabólicas em que há o aumento de lipídeos circulantes no sangue mostram uma relação com o desenvolvimento de inflamação de baixo grau (CHHIBBER; SORIANO; TAYEK, 2000; LIU et al., 2014). A mediadores lipídicos também contribuem para o estado imune e metabólico do tecido adiposo. A prostaglandina E2 (PGE2) é importante para a diferenciação de adipócitos e regulação da lipólise de uma maneira autócrina e parácrina enquanto em quadros de obesidade (YAN et al., 2003). Em modelos de diabetes tipo 1, houve redução na hiperlipidemia diante da inibição do receptor para LTB4, evidenciando uma relação entre a presença desse mediador e o metabolismo lipídico sistêmico (RAMALHO et al., 2019).

1.7. Modelo de hiperglicemia induzida por estreptozotocina

A Estreptozotocina (STZ) [N-(methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine] é uma droga utilizada como antibiótico de amplo espectro isolada de bactérias *Streptomyces achromogenes* presentes no solo (NAHDI; JOHN; RAZA, 2017). Devido as propriedades citotóxicas, essa droga também foi amplamente utilizada na terapia antitumoral até que por volta dos anos 60 suas propriedades em promover hiperglicemia foram descritas (SRIVASTAVA; BORA; BHATT, 1982).

A STZ promove a destruição seletiva das células β - pancreáticas produtoras de

insulina sendo bastante utilizada em protocolos de indução ao diabetes em animais modelo como ratos, camundongos e macacos, que apresentaram grande sensibilidade a droga (FURMAN, 2015). O modelo de indução em múltiplas doses baixas de STZ leva a hiperglicemia de maneira muito semelhante ao diabetes tipo 1, com inflamação das ilhotas pancreáticas e deficiência na produção de insulina, além de apresentar baixo custo quando comparado a modelo animal geneticamente modificado para DT1 (FURMAN, 2015).

O transportador de glicose, GLUT2 é a molécula alvo da ação da STZ e está amplamente presente nas células β -pancreáticas uma vez que funciona como sensor da glicemia sistêmica. Após a interação com o transportador, a STZ induz desbalanço no estado redox da célula, levando ao estresse oxidativo e consequentemente ao dano de DNA (HOSOKAWA; DOLCI; THORENS, 2001; WANG; GLEICHMANN, 1998).

Em baixas doses de STZ, as células β -pancreáticas são parcialmente danificadas iniciando um processo inflamatório que posteriormente leva a perda das atividades na produção de insulina, resultando em hiperglicemia. Por razões cinéticas, a hiperglicemia estabelecida tardiamente nesse protocolo não pode ser devida a ação tóxica da droga (FURMAN, 2015). Por esse motivo protocolo de indução de múltiplas doses baixas é amplamente utilizado por causar menos efeitos colaterais quando comparado ao protocolo de uma única alta dose.

Até então, no diabetes tipo 1, sabe-se que os leucotrienos estão envolvidos com o estabelecimento da inflamação sistêmica, com a hiperlipidemia e com o fenótipo pró-inflamatório em macrófagos. Sabe-se também, que o metabolismo oxidativo dessas células está ligado a esse mediador. Entretanto, qual via metabólica e qual o papel desta na função e no fenótipo de macrófagos peritoneais ainda não tinha sido estudado

Neste trabalho especulamos que na condição de diabetes tipo 1, sob o efeito de leucotrienos, macrófagos peritoneais sofram reprogramação metabólica aumentando a atividade oxidativa mitocondrial de modo que este fenômeno seja importante para função dessa célula. Além disso, também sugerimos que as alterações metabólicas sistêmicas observadas no diabetes possam ter um papel importante no evento de reprogramação metabólica dos macrófagos.

2. OBJETIVO

Compreender qual o efeito dos leucotrienos na reprogramação metabólica e no estado funcional de macrófagos diante das alterações metabólicas sistêmicas observadas no diabetes tipo 1.

Para isso, buscou-se entender os seguintes pontos:

- Os efeitos da produção dos leucotrienos na inflamação da cavidade peritoneal,
- Os efeitos da produção dos leucotrienos no metabolismo energético de macrófagos
- A relação entre o metabolismo energético e a produção de citocinas por macrófagos
- A relação entre alterações metabólicas sistêmicas no DT1 e o metabolismo celular de macrófagos peritoneais

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste trabalho utilizamos camundongos machos 129 SvE, e 129 ALOX, sendo este *knock-out* completo da enzima 5-lipoxigenase (5LO), responsável pela produção de leucotrienos. Também utilizamos camundongos fêmeas BLT1^{-/-}LysM^{cre}, *knock-out* para receptor BLT1 apenas em células mieloides e seu correspondente C56BL/6 selvagem. Todos os camundongos tinham de 10 a 12 semanas de idade . e foram mantidos em condições livres de patógenos, no ciclo de 12 horas de claro e escuro com acesso livre à água e ração. O enriquecimento ambiental foi priorizado. Todos os procedimentos nos camundongos utilizados seguiram as normas do Comitê de Ética em uso animal do ICB/USP, e do *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)* da Vanderbilt University Medical Center.

3.2. Protocolo de Indução a hiperglicemia do Diabetes tipo 1

Os camundongos 129 SvE, e 129 ALOX foram mantidos em privação alimentar por um período de 4 a 5 horas seguido de injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ) (Cayman)(60 mg/Kg em tampão citrato 0,1M pH 4,5). Após uma hora da injeção, a ração era recolocada. Este protocolo seguiu um período de 5 dias consecutivos. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia maior que 250 mg/dL(13,9 mM/L) no décimo dia após a última dose de STZ, totalizando 15 dias de protocolo no total.

3.3. Coleta de macrófagos peritoneais

A cavidade peritoneal dos animais 129 SvE e 129 ALOX foi lavada com 8 mL de PBS estéril gelado. A suspensão de células foi centrifugada a 1500rpm, 10min, 4°C, e posteriormente colocadas em placas de cultura de 6 ou 12 poços em densidades pré-estabelecidas pelos ensaios utilizados. As células foram cultivadas

em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium -Gibco®) low glucose (5mM) com estreptomicina (10mg/mL) incompleto (sem SFB). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa úmida (5% CO₂ a 37°C) por 1 hora para adesão dos macrófagos no fundo do poço. Após incubação as células foram lavadas com PBS a 37°C para remoção de células não aderidas.

3.4. Citometria para caracterização do fenótipo das células peritoneais

As células obtidas do lavado peritoneal foram centrifugadas e o pellet foi ressuspendido em FACS buffer (PBS contendo 1% de FBS). As células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluoróforo CD45-APC-Cy7 (BD), CD11b-Pacific Blue (BD), Ly6C-PE (eBioscience), F4/80-FITC (Serotec) por 30 minutos. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II. Os resultados coletados foram referentes a 10.000 eventos por amostra e a análise foi realizada com o software FlowJo (TreeStar).

A estratégia de gate partiu do grupo de células excluindo os *debris* (A). Nos parâmetros de área das células (FSC-A) e altura (FSH-H) foram excluídas células detectadas em duplas e demais artefatos (*Single Cells*) (B). Em seguida, sob as marcações de CD45 e CD11b foram selecionadas as populações CD45⁺CD11b⁺ e CD45⁺CD11b⁻ (C). Dentro de CD45⁺CD11b⁺, foram selecionados os marcadores granulocidade (SSC-A) e F4/80 e marcada a população F4/80⁺ (D). Ainda dentro de CD45⁺CD11b⁺, nos parâmetros SSC-A e Ly6C foi marcada a população Ly6C⁺ (E) (ilustrado na figura 3 abaixo).

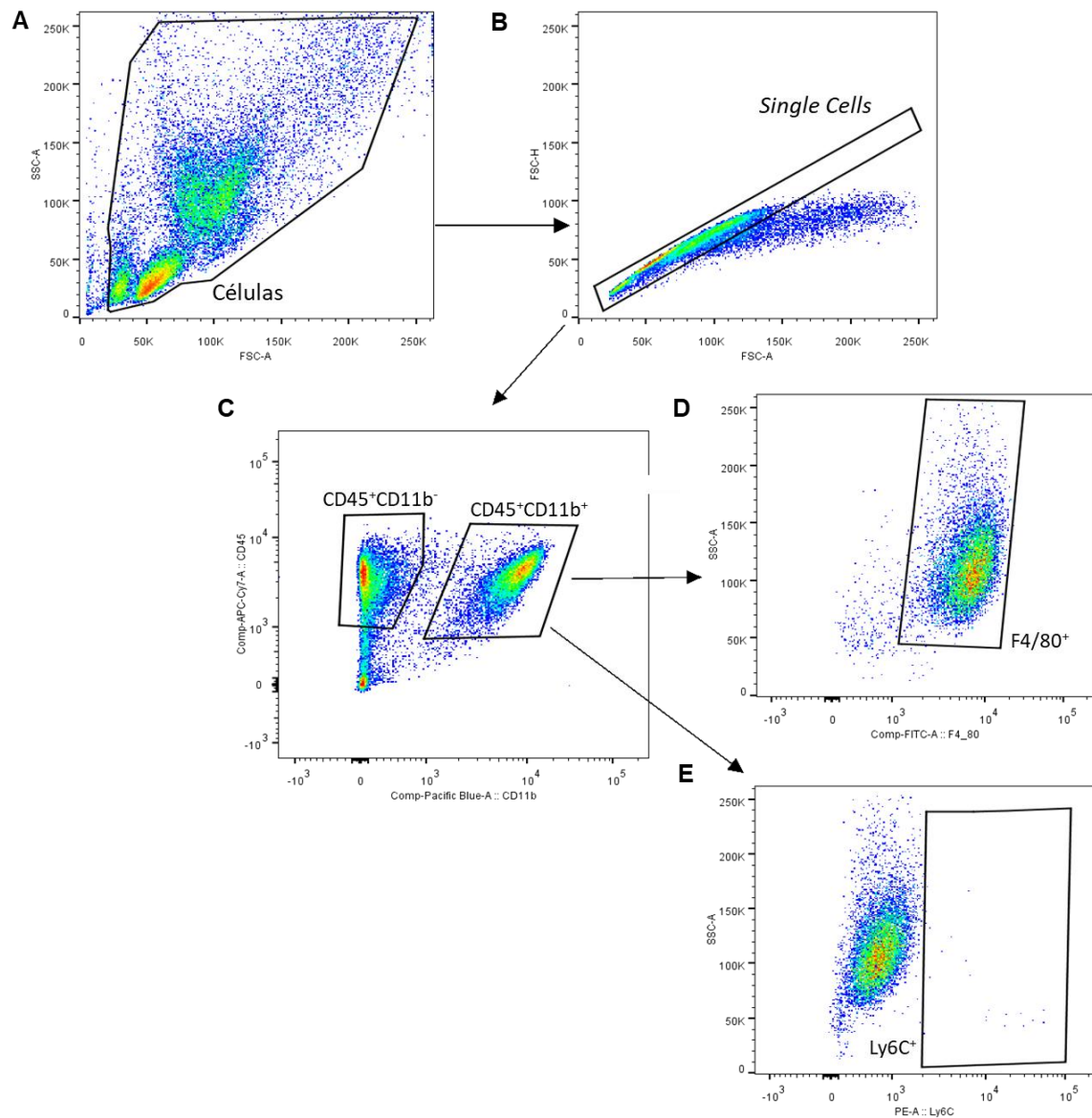


Figura 3. Estratégia de gate para fenótipo de células peritoneais. Lavado peritoneal de animais WT e 5LO^{-/-}, saudáveis e diabéticos foi coletado e avaliado via citometria de fluxo. A estratégia de Gates excluiu debris (A) e artefatos (B), marcou população CD45⁺CD11b⁺ e CD45⁺CD11b⁻(C), F4/80⁺ (D) e Ly6C⁺(E). Gate ilustrativo de amostra de animais WT saudáveis.

3.5. Análise da expressão gênica

Os macrófagos de camundongos 129 SvE e 129 ALOX foram lisados utilizando TRIzol e extraídos com Direct-Zol (Zymo Research), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi confeccionado utilizando *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) e a concentração de RNA utilizada foi padronizada para todas as amostras e testes. A qPCR foi realizada no instrumento StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific) usando SYBR Green Fast (Applied Biosystem) e os primers *Ucp1*, *Stat1*, *Nos2*, *Arg1*, *Chil3l*, e *Hprt* (gene de referência). A sequência dos primers está apresentada na tabela 1 abaixo. A expressão relativa foi calculada utilizando-se o limiar (Ct) comparativo e a expressão relativa de acordo com o grupo controle ($\Delta\Delta C_t$ method).

Tabela 1 Sequência dos primers mouse

PRIMERS	FABRICANTE	SEQUÊNCIA
<i>Hprt</i>	Exxtend	F: 5'-AACAAACTCTGGCCTGTATCC-3'
		R: 5'-CCCCAAAATGGTTAAGGTTGC-3'
<i>Ucp1</i>	Exxtend	F: 5'-CACACCTCCAGTCATTAAGCC-3'
		R: 5'-CAAATCAGCTTTGCCTCACTC-3'
<i>Stat1</i>	Exxtend	F: 5'-GACTTCAGACACAGAAATCAACTC-3'
		R: 5'-TTGACAAAGACCACGCCTT-3'
<i>Arg1</i>	Exxtend	F: 5'- AGTGTGATGTCAGTGTGAGC-3'
		R: 5'- GAATGGAAGAGTCAGTGTGGT-3'
<i>Chil3l3</i>	Exxtend	F: 5'- ACTGGTATAGTAGCACATCAGC-3'
		R: 5'- AGAAGCAATCCTGAAGACACC-3'
<i>Nos2</i>	Exxtend	F: 5'- CACTTCTGCTCCAAATCCAAC-3'
		R: 5'- GACTGAGCTGTTAAGAGACACTT-3'

3.6. Análise dos dados do RNAseq de macrófagos

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de animais C57BL/6 selvagens saudáveis e diabéticos foram processados para análise do transcriptoma total. O processamento das amostras e execução do experimento foi realizado por alunos do Professor Henrique Serezani – Vanderbilt University Medical Center

(VUMC). A metodologia usada foi a Multiplex Paired-End 150 bp no equipamento Illumina NovaSeq 6000. A limpeza dos dados, normalização da expressão gênica e produção dos *HeatMaps* foram executadas neste estudo via script da linguagem de programação *Python*.

Dentro do *dataset* original foram separados majoritariamente aqueles genes que apresentavam diferenças significativas ($p < 0.05$) no *fold change* de diabéticos x saudáveis. Esse *dataset* foi explorado em *Python* com funções das bibliotecas *Pandas* e *scikit-learn*. A normalização dos dados foi feita pela biblioteca *scikit-learn*, utilizando a função *df.sklearn.preprocessing.normalize*, na qual cada expressão gênica individual foi dimensionada para uma norma unitária, de modo que os valores de normalização estivessem de acordo com o *fold change* de cada gene diabético x saudável. Os dados normalizados foram utilizados para a produção dos *HeatMaps* no programa estatístico Graphpad Prism 9.

3.7. Análise de Enriquecimento dos genes do RNAseq

O código de identificação de cada gene de interesse foi adicionado na base de dados online: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8*. A classificação dos genes se deu pela categoria *Biological Process (BP): Gene Ontology (GO)*, termo *metabolic process* (59,9 % dos genes testados estavam nesse termo, *fold enrichment 1,1*). A lista de genes presente em *metabolic process* passou novamente pela análise de enriquecimento, desta vez mais detalhada (*GOTERM_BP_4*), gerando as sub-categorias metabólicas descritas nesse trabalho.

3.8. Ensaio de Taxa de consumo de Oxigênio (MitoStress - Seahorse)

Células peritoneais foram plaqueados na densidade de 8×10^4 células/ poço em placas xFe96 (*Agilent*) de 96 poços. Cinco replicatas foram usadas para cada animal de cada grupo experimental. Após incubação de 1 hora em meio DMEM low glucose (5mM), trocou-se o meio para DMEM medium glucose (10 mM) sem bicarbonato de sódio e pH 7.4, adequado para a realização do experimento. Depois as células contendo o meio do ensaio foram incubadas a 37°C por 1 hora em uma incubadora sem dióxido de carbono. O ensaio utilizado para quantificar a taxa de consumo de

oxigênio (OCR) nos diferentes grupos experimentais foi o *MitoStress*. As concentrações das drogas utilizadas, assim como a densidade celular foram determinadas previamente em ensaios de padronização. Utilizamos Oligomicina, CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) e Rotenona a $1\mu\text{M}$ cada, e Antimicina a $1.8\mu\text{M}$. Três quantificações foram realizadas no início do ensaio para determinar o OCR basal e após a injeção de cada droga. Cada parâmetro obtido desse ensaio foi calculado segundo as recomendações técnicas do fabricante, como ilustrado na figura 4 e descrito a seguir :

A - Respiração Basal foi calculado a partir da média dos três primeiros pontos de leitura (anteriores a Oligomicina) subtraída dos três últimos pontos de leitura (posteriores a Rotenona e Antimicina).

B - Produção de ATP é obtida a partir da média dos três primeiros pontos (anteriores a Oligomicina) subtraída da média dos três pontos posteriores ao uso de Oligomicina.

C - Vazamento de Prótons é a subtração da média dos pontos obtidos após o uso de oligomicina menos a média dos últimos pontos de leitura (posteriores a Rotenona e Antimicina).

D - Respiração Máxima foi obtida pela média dos pontos obtidos após o tratamento com CCCP subtraída da média dos últimos pontos de leitura (posteriores a Rotenona e Antimicina).

E - Capacidade de reserva é subtração da média dos pontos obtidos após o tratamento com CCCP subtraída da média dos três primeiros pontos.

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile Mitochondrial Respiration

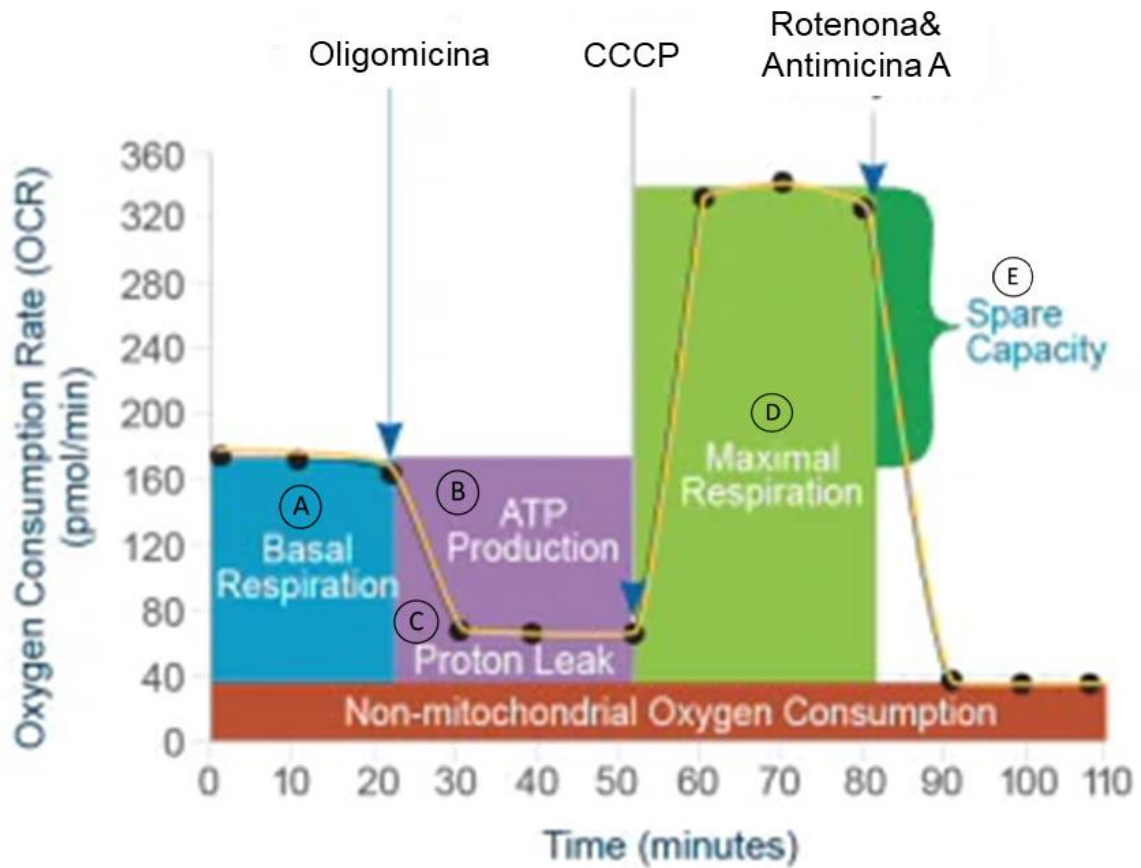


Figura 4. Figura esquemática do cálculo de parâmetros no ensaio Mito stress (Seahorse – Agilent). No eixo Y: Taxa de consumo de Oxigênio(OCR), **A.** Respiração Basal, **B.** Produção de ATP, **C.** Vazamento de Prótons, **D.** Respiração Máxima, **E.** Capacidade de Reserva. Imagem adaptada do Guia do usuário : *Agilent Seahorse XF Cell. Mito Stress Test Kit.*

3.9. Inibição da via de oxidação de ácidos graxos

Após uma hora de adesão dos macrófagos peritoneais à placa, adicionou-se meio de cultura DMEM low glucose incompleto (5mM) contendo etomoxir (4 μ M), para o ensaio de inibição da oxidação de ácidos graxos. As células ficaram sob incubação em estufa úmida (5% CO₂ a 37°C) por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e as células colocadas em TRIzol para extração de RNA. A droga foi testada previamente em ensaio de MTT para avaliação de citotoxicidade.

3.10. Dosagem de citocinas

A citocina IL-12 foi dosada no lavado peritoneal. As citocinas IL-12, IL-10 e IL-1 β foram dosadas no sobrenadante das culturas de macrófagos. Já as citocinas IL-12, TNF- α , IL-6 e MCP-1 foram dosadas no tecido adiposo processado em RIPA. Kits de ELISA (BD) foram utilizados para mensuração das citocinas de acordo com as recomendações do fabricante. Os valores mínimos de detecção foram calculados de acordo com o último ponto da curva-padrão designada para cada teste(IL-10 : 33 pg/ml; IL-1 β : 50 pg/ml; IL-12, IL-6, MCP-1 e TNF α : 15 pg/ml).

3.11. Ensaio de viabilidade celular – MTT

Células retiradas do peritônio de animais saudáveis foram plaqueados na densidade de 4x10⁵ células/poço em uma placa de 96 poços. As células foram mantidas por trinta minutos em estufa úmida (5% CO₂ a 37°C) para adesão e então foram tratadas com Etomoxir a 4 μ M ou apenas meio de cultura para o controle. Após quatro horas sob tratamento, foi adicionado 20 μ l de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5mg/ml) (M5655- Sigma Aldrich) em cada poço e as células foram submetidas a mais quatro horas de incubação, protegidas da luz, em estufa úmida para a formação dos cristais. Ao final, o sobrenadante foi retirado e 100 μ l de DMSO foram adicionados para a dissolução dos cristais formados. A placa foi lida em espectrofotômetro de placa SpectraMax190 em 570nm, e a análise foi realizada pelo software SoftMax Pro 4.0 (ambos Molecular Devices).

3.12. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio mitocondriais (MitoSOX)

Células peritoneais de animais diabéticos e saudáveis foram coletadas e processadas para citometria de fluxo (assim como descrito anteriormente). As células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluoróforo CD45-PECy7 (Biolegend), CD11b-FITIC(BD), F4/80-APC (BD) e Viabilidade (LIVE/DEAD) - Pacific Blue (Invitrogen) por 30 minutos, então lavadas e marcados com MitoSOX (Thermogen) por 10 min como orientado pelo fabricante. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II. Os resultados coletados foram referentes a 10.000 eventos por amostra e a análise foi realizada com o software FlowJo (TreeStar) a partir da média de intensidade de fluorescência (MFI)de MitoSOX.

A estratégia de *gate* partiu do grupo de células excluindo os *debris* (A). Nos parâmetros de área das células(FSC-A) e altura (FSH-H) foram excluídas células detectadas em duplas e demais artefatos (*Single Cells*) (B). Em seguida, foi selecionada a população negativa para o marcador *LIVE/DEAD* que marca as células mortas(C). Nas marcações de CD45 e CD11b foi selecionada a população CD45⁺CD11b⁺ (D). Dentro de CD45⁺CD11b⁺, foram selecionados os marcadores granulocidade (SSC-A) e F4/80 e marcada a população F4/80⁺ (E).Dentro da população F4/80⁺ buscamos pelas células positivas para *MitoSOX* (Ilustrado na figura 5 abaixo).

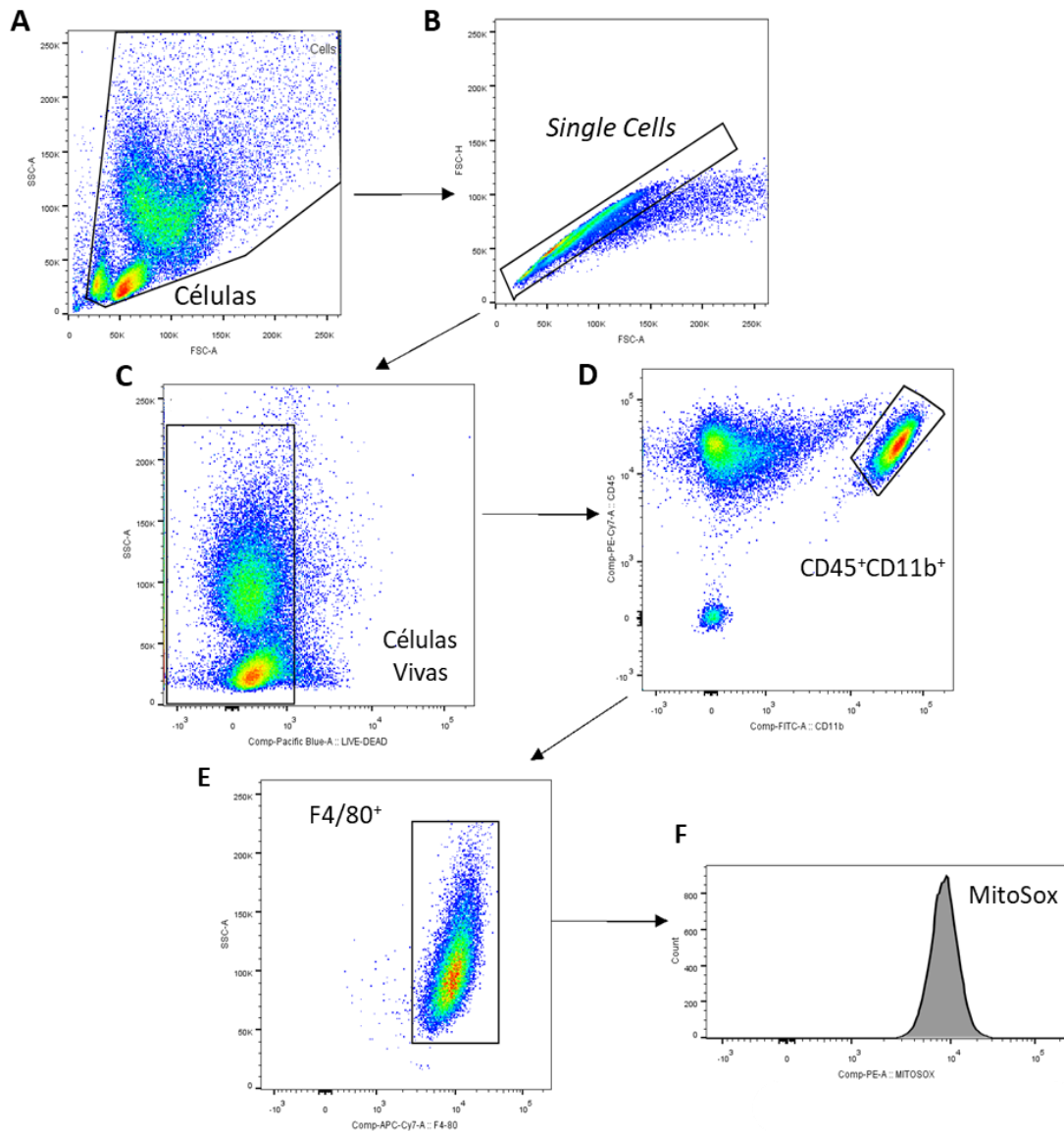


Figura 5. Estratégia de gate para MitoSOX. Lavado peritoneal de animais WT e 5LO^{-/-}, saudáveis e diabéticos foi coletado e avaliado via citometria de fluxo. A estratégia de Gates excluiu debris (A) e artefatos (B), marcou Células vivas (negativas) (C), população CD45⁺CD11b⁺(D), células F4/80⁺(E) e Espécies Reativas de Oxigênio mitocondriais (F). Gate ilustrativo de amostra de animais WT saudáveis.

3.13. Cultura de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

Células 3T3-L1 (Zenbio®) foram mantidas crescendo em DMEM High Glucose (25mM), 10% FBS, até atingir aproximadamente 70% de confluência. Para a diferenciação em adipócitos, as células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços na densidade de 5×10^4 células/poço, em seguida as células foram estimuladas com um coquetel de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM (Sigma-Aldrich®), Dexametasona 1uM (Sigma-Aldrich®), Insulina 3uI/ml (Novolin® N) e Rosiglitazona 1uM (Sigma-Aldrich®). A cada três dias, meio contendo insulina foi adicionado às células como meio de manutenção. Ao final de uma semana, as células estavam completamente diferenciadas em adipócitos

3.14. Ensaio de padronização de lipólise em 3T3-L1

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (25mM), sem fenol, incompleto foi suplementado com 2% de albumina de soro bovino (BSA) visando um meio de cultura livre de lipídeos derivados de outras fontes e adequado para um ensaio de lipólise. O estímulo a lipólise foi dado por CL-316243(10 μ m) (Sigma-Aldrich®), um fármaco agonista do receptor β 3-adrenérgico. A dosagem do Glicerol Livre foi realizada por ensaio enzimático colorimétrico (Glycerol Assay Kit - Sigma-Aldrich®) 1, 2, 4, 6 e 8 horas após o estímulo nos grupos tratado e controle.

3.15. Coleta e diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Células de medula óssea do fêmur e tíbia de C57BL/6 selvagens saudáveis e diabéticos e de animais saudáveis BLT1^{-/-}LysM^{cre} foram coletadas, centrifugadas e incubadas com tampão ACK (Gibco) para lise de eritrócitos. As células restantes foram semeadas para diferenciação em meio de incubação suplementado com o fator de diferenciação para macrófagos M-CSF (20 ng/ml). A cada três dias o meio de diferenciação era renovado e ao final de sete dias os macrófagos estavam diferenciados e prontos para a experimentação.

3.16. Estimulo de macrófagos com meio condicionado derivado de lipólise

BMDM foram descolados da placa de diferenciação com ajuda de Tripsina e raspador, contados e plaqueados novamente com a densidade de 5×10^5 em placas de 6 poços. O sobrenadante obtido no ensaio de lipólise foi adicionado a essas células e incubado por horas. Então, as células foram lisadas em tampão RIPA para posterior extração de proteína. As amostras tiveram os níveis de proteína medidos por ensaio de proteína BCA (Pierce TM BCA Protein Assay Kit), padronizadas em 20 ug /ul e preparadas para análise de western blot de UCP1(Cell signaling).

3.17. Western Blot

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em solução de bloqueio para evitar ligação inespecífica e incubadas *overnight* em anticorpo anti-UCP1 (Cell Signaling, IgG- coelho). O anticorpo conjugado IR Dye- Dunkey 680 LT (Li-COR, anti-coelho) foi usado como anticorpo secundário e β -actina (BA3R, Invitrogen) como controle endógeno. As membranas foram analisadas por fluorescência de imagem. A quantificação foi realizada por densimetria em que a expressão proteica de UCP1 foi compensada pela expressão proteica de β -Actina.

3.18. Histologia do tecido adiposo

O tecido adiposo de animais saudáveis e diabéticos foi coletado, separado e armazenado em tubos *ependorfs* contendo paraformaldeído para fixação. O tecido foi então desidratado em série de álcoois 70%,80%,96% e 100%, clarificado em xilol e incluído em parafina. As lâminas foram hidratadas para a coloração com Hematoxilina e Eosina e posteriormente desidratadas novamente para a montagem em lamínula com resina. Todo o processamento do material foi feito pelo Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV/USP.

3.19. Quantificação do tamanho dos adipócitos

Esse parâmetro foi calculado a partir da ferramenta *Adiposoft* do software de análise de imagem *ImageJ*. *Adiposoft* é especializado para quantificação de adipócitos em extensões histológicas. A calibração de *pixel* em micrometro (μM) foi realizada a partir de câmara de Neubauer fotografada no aumento de 40x. As imagens de cada amostra foram analisadas em aumento de 40x, nelas foram contadas o número de adipócitos e o tamanho de cada um deles, ignorando aqueles nas regiões de borda da imagem.

3.20. Avaliação do ganho de massa corporal e consumo de ração

A condição corpórea dos animais foi analisada a partir da pesagem dos animais desde o primeiro dia da indução do diabetes até o 11^o dia de protocolo. O ganho de peso foi calculado com relação ao peso inicial (dia 1). O consumo de ração foi mensurado de maneira individual. Cada animal era isolado dos demais e a quantidade de ração oferecida era anotada diariamente. Após 24h, a ração restante era pesada e o peso foi subtraído do valor de ração oferecida. O consumo diário dos animais foi compensado com o peso do animal naquele mesmo dia.

3.21. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As análises foram feitas a partir de ANOVA de dois parâmetros para os testes com amostras independentes e paramétricas (Teste de normalidade Shapiro-Wilk) com mais de dois grupos e dois fatores a serem analisados. A comparação das médias foi feita por teste de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism , versão 9.0 (Graph Pad Software).

4. RESULTADOS

4.1. No diabetes, leucotrienos estão envolvidos na migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal e na diferenciação de macrófagos

Trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo mostraram que em animais diabéticos, a inflamação crônica de baixo grau, assim como o perfil pró-inflamatório de macrófagos peritoneais é modulada pela ativação do receptor de Leucotrienos B4 (LTB4), o BLT1 (FILGUEIRAS et al., 2015b; RAMALHO et al., 2018). Buscando expandir esses estudos, avaliamos a condição inflamatória da cavidade peritoneal de animais saudáveis e diabéticos comparando, por citometria de fluxo, o lavado peritoneal de camundongos que não produzem leucotrienos (*knock-out* (KO) da enzima 5LO) com seu correspondente WT.

Nossos dados mostraram que os leucotrienos exercem um papel importante na composição celular da cavidade peritoneal no contexto de diabetes. A frequência de células CD45⁺CD11b⁻ foi menor em animais diabéticos 5LO^{-/-} em relação a WT diabético (FIG.6A). A frequência CD45⁺CD11b⁺ foi maior em animais diabéticos 5LO^{-/-} em comparação ao grupo de diabéticos WT (FIG.6B). A maior parte das células CD45⁺CD11b⁺ peritoneais eram macrófagos residentes (F4/80⁺) (FIG.6C), caracterizando, portanto, o grupo CD45⁺CD11b⁺ como células mieloides.

No contexto de diabetes ocorreu uma migração considerável de monócitos (Ly6C⁺) para a cavidade peritoneal em animais WT, de maneira dependente de leucotrienos (FIG.6D). Juntos, esses dados indicam que a população de células na cavidade peritoneal é alterada na condição de diabetes, e na ausência de leucotrienos, a alteração na composição celular acontece de forma menos pronunciada.

Devido as alterações na composição de células da cavidade peritoneal, citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-6 e MCP-1 foram dosadas no lavado peritoneal. Apenas IL-12 esteve dentro do limite mínimo de detecção do ensaio de ELISA. Observamos uma produção significativa dessa citocina em animais WT diabéticos quando comparado ao saudável. Na condição de diabetes, a quantidade de IL-12 no peritônio de animais 5LO^{-/-} foi menor quando comparado a animais WT

(FIG.6E) . Macrófagos são células produtoras de IL-12 em contexto de inflamação. Isso nos sugere que a IL-12 pode estar sendo produzida por macrófagos derivados de monócitos que migraram para a cavidade peritoneal de forma dependente dos leucotrienos. Esquema de gates de cada grupo está descrito na figura 7.

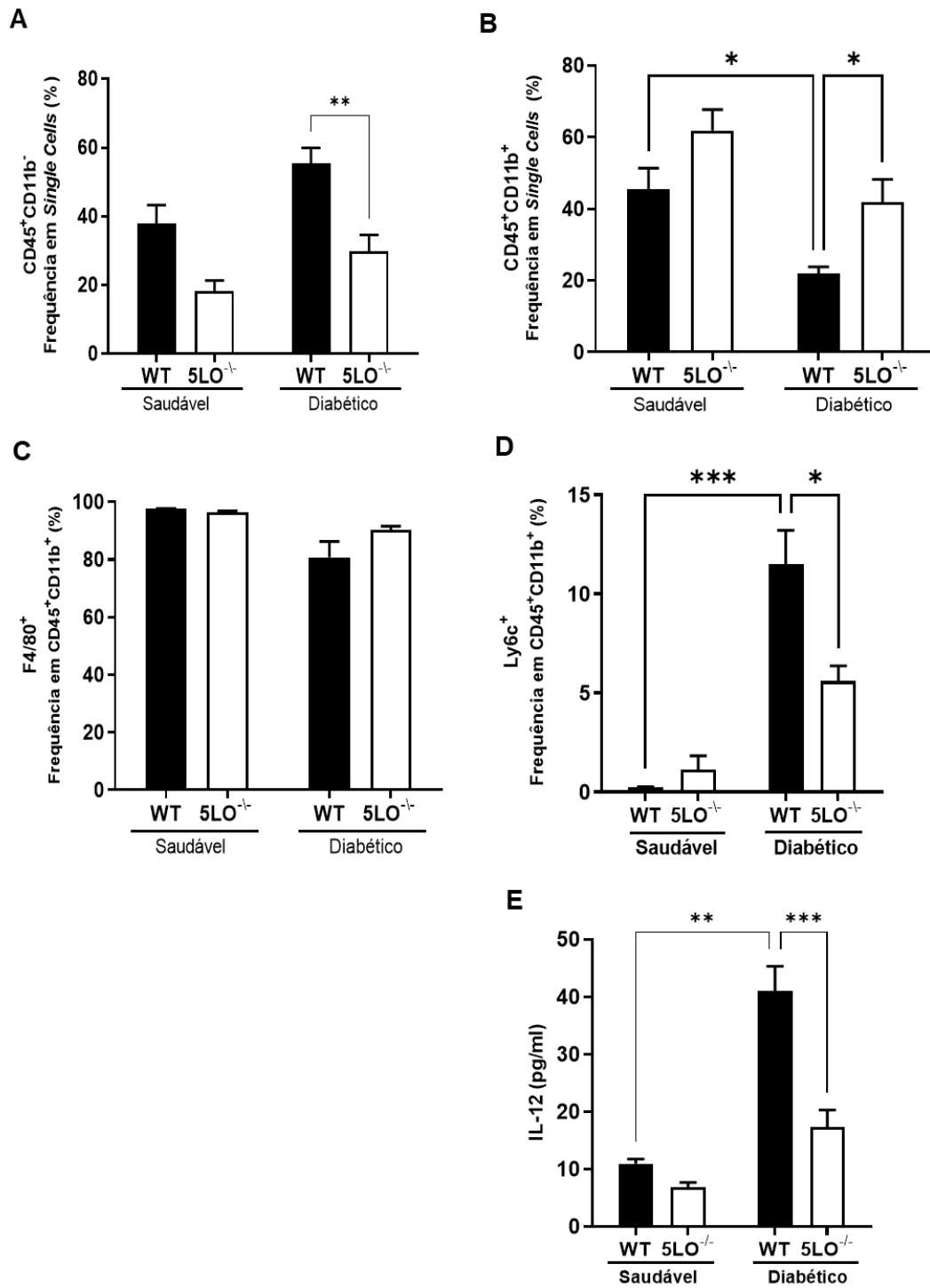


Figura 6. Composição celular e produção de IL-12 no peritônio de camundongos saudáveis e diabéticos. Frequência (%) de células presentes no peritônio e dosagem de IL-12 no lavado peritoneal de animais WT e 5LO^{-/-}. n = 3 a 7. Média ± SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Interação entre leucotrienos e diabetes: (*) para Ly6C⁺ (D) e IL-12(E); Diabetes: (*) para CD45⁺CD11b⁻ (A) e F4/80⁺(C), (**) para CD45⁺CD11b⁺(B), (****) para Ly6C⁺ (D) e IL-12(E); Leucotrienos: (*) para Ly6C⁺ (D), (**) para CD45⁺CD11b⁺(B) e IL-12(E), (****) para CD45⁺CD11b⁻ (A). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****). Resultado representativo de dois experimentos independentes.

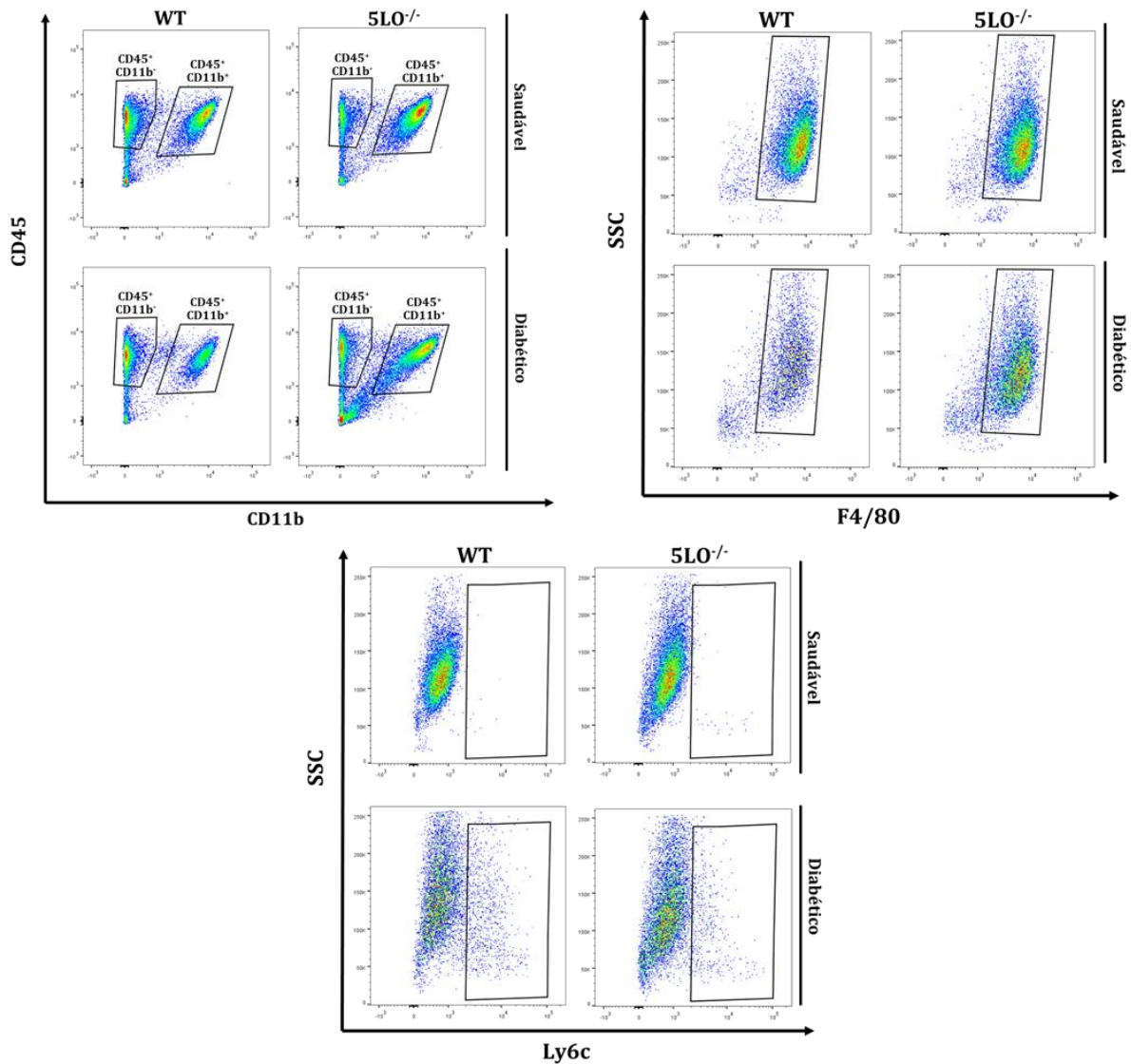


Figura 7. Esquema de gates na citometria da composição celular do peritônio de camundongos saudáveis e diabéticos, WT e 5LO^{-/-}.

Diante das evidências de um processo pró-inflamatório na cavidade peritoneal de animais diabéticos, nos questionamos como seria o perfil dos macrófagos obtidos dessa cavidade. Quando incubamos os macrófagos em cultura, sem qualquer estímulo exógeno, macrófagos derivados de animais WT diabéticos mostraram significativo aumento na produção de IL1 β , IL-12 e IL-10 quando comparados aos correspondentes saudáveis (FIG 8.A, B e C). Ao passo que macrófagos de animais diabéticos 5LO^{-/-} apresentaram menor produção de IL-12 e IL-10 quando comparados aos diabéticos WT.

Somado a isso, macrófagos de animais diabéticos WT aumentam a expressão gênica de marcadores de ativação, como *Nos2* e *Stat1* em relação ao correspondente saudável. Na condição de diabetes, o nível de expressão de *Nos2* e *Stat1* em animais 5LO^{-/-} foram menores em relação a WT (FIG 8.D e E). *Arg1* e *Chi3l3* são marcadores predominantemente expressos em macrófagos com fenótipo de reparo. Curiosamente, tanto a expressão de *Arg1* quanto de *Chi3l3* foram aumentadas em macrófagos WT diabéticos em relação ao grupo saudável (FIG 8.F e G) Isto pode sugerir que a expressão de marcadores de reparo, assim como a produção de IL-10, funcione como um contrabalanço ao estado de inflamação crônica, mitigando danos causados por esta condição.

Esses resultados ressaltam o efeito da inflamação crônica de baixo grau do diabetes em macrófagos peritoneais. Os leucotrienos aparecem como fatores intensificadores da inflamação nesse contexto, induzindo a quimiotaxia de células para o peritônio e influenciando no perfil dos macrófagos e na produção de citocinas. Os dados aqui descritos corroboram os achados sobre inflamação crônica e perfil de macrófagos feitos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (FILGUEIRAS et al., 2015b; RAMALHO et al., 2018). Diante disto, nos questionamos se a condição de inflamação crônica do diabetes afetaria o metabolismo de macrófagos peritoneais

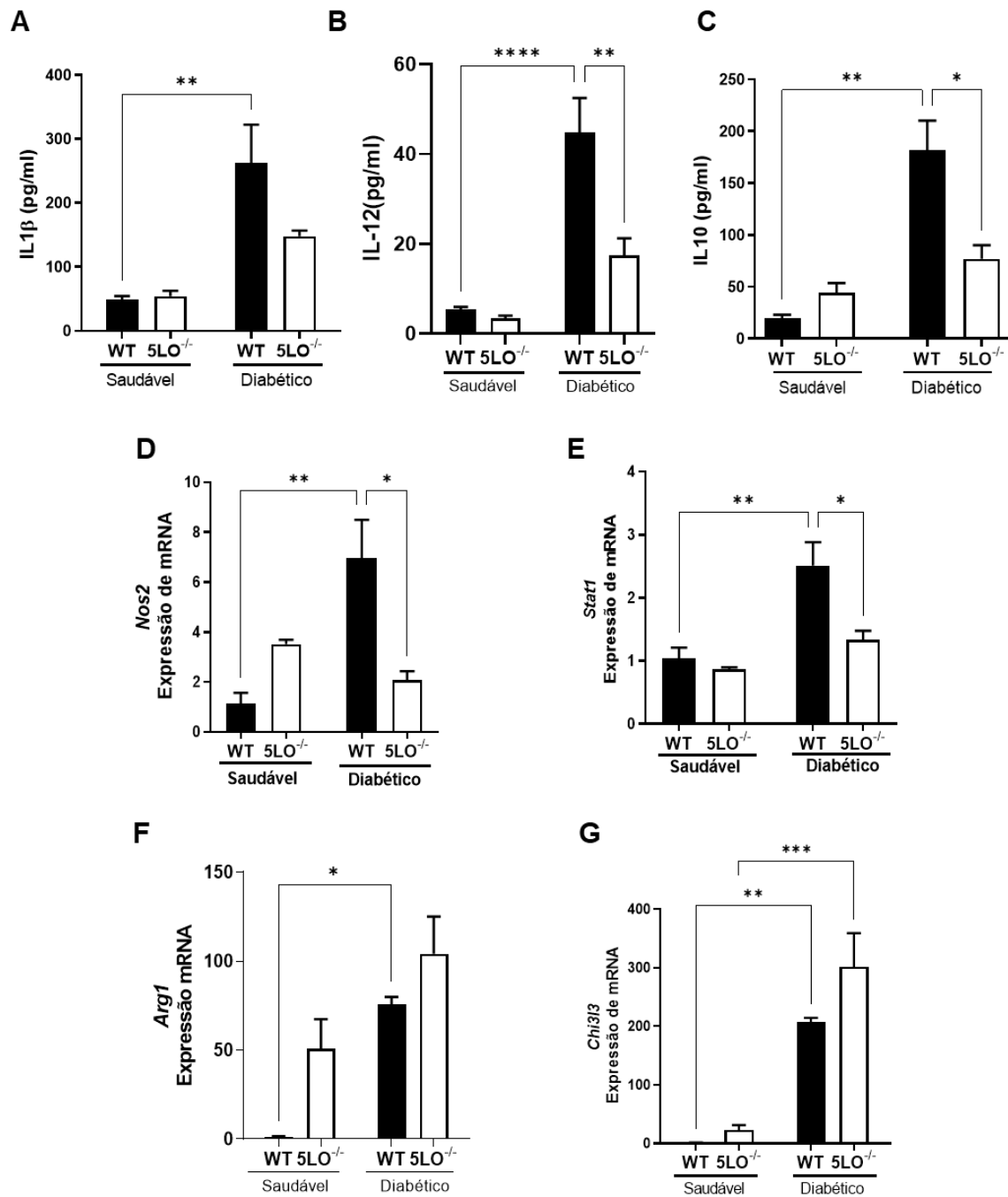


Figura 8. Citocinas e expressão gênica de marcadores de ativação de macrófagos peritoneais de animais saudáveis e diabéticos. Dosagem por ELISA de IL-1 β , IL-12 e IL-10 do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de animais WT e 5LO^{-/-} que posteriormente foram processados para análise de expressão gênica. n = 3 a 6. Média \pm SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Interação entre leucotrienos e diabetes: (*) para IL-10(C) e Stat1(E) (**) para IL-12(B) e Nos2 (D); Diabetes: (*) para Nos2 (D), (**) para IL-1 β (A), IL-10(C), Stat1(E) e Arg1 (F), (****) para IL-12(B) e Chi3i3 (G); Leucotrienos: (*) para Stat1(E) e Stat1(E), (**) para IL-12(B). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).

4.2. Leucotrienos intensificam o metabolismo oxidativo de macrófagos peritoneais de animais diabéticos.

Conhecendo o perfil de ativação dos macrófagos peritoneais na condição de diabetes, partimos para análise metabólica dessas células. Para compreender, de maneira geral qual via metabólica está modulada no contexto de diabetes, uma análise de enriquecimento foi realizada em um *RNAseq* de macrófagos derivados de animais diabéticos e saudáveis.

Genes ligados a vias sensíveis aos níveis de nutrientes estavam mais expressos em macrófagos de animais diabéticos quando comparados aos saudáveis (FIG.9A). Diante disso, observamos como a expressão dos genes das vias metabólicas se comportava nessas células. Para a via de catabolismo de carboidratos (FIG.9B), a maior parte dos genes estava menos expresso na condição de diabetes. Já os genes ligados a resposta celular a ácidos graxos(FIG.9C) estavam predominantemente mais expressos em macrófagos de animais diabéticos indicando que o metabolismo de lipídeos poderia estar alterado nessas células.

Para avaliar se a resposta a ácidos graxos era devido a síntese ou a oxidação, avaliamos a expressão dos genes dessas duas vias. Genes relacionados a biossíntese de ácidos graxos estavam majoritariamente menos expressos em macrófagos de animais diabéticos quando comparados a animais saudáveis . Isto sugere que a resposta a ácidos graxos dessas células não é consequência da síntese dessas moléculas (FIG.9D). A via de oxidação de ácidos graxos propriamente não foi contemplada pela base de dados utilizada na análise, porém o conjunto de genes ligados a proteínas presentes na membrana interna mitocondrial, diretamente ligados ao metabolismo oxidativo, apresentam propensão a maior expressão em macrófagos de animais diabéticos.(FIG.9E). Os valores de expressão gênica individuais estão apresentados na tabela 2.

É interessante notar que a expressão da proteína desacopladora *Ucp1*, comumente presente em adipócitos termogênicos marrons e bege, e fortemente ligada a oxidação de lipídeos, estava presente em macrófagos e foi modulada positivamente na condição de diabetes. Além disso, o gene *Ucp1* apareceu em 3 das 5 vias avaliadas na análise de enriquecimento, tendo o maior nível de *fold change* entre macrófagos de saudáveis e diabéticos quando comparado com o *fold-change*

dos demais genes.-

Esses dados corroboram os resultados de RAMALHO et al., 2019 nos quais foi sugerido que macrófagos de animais diabéticos apresentavam alta atividade oxidativa mitocondrial ligada a captação de lipídeos através do receptor CD36. Ainda nesse estudo, a autora demonstra que na condição de DT1, a ativação do receptor de LTB4 (BLT1) promove maior atividade mitocondrial de forma dependente da via desacoplada à síntese de ATP em macrófagos peritoneais.

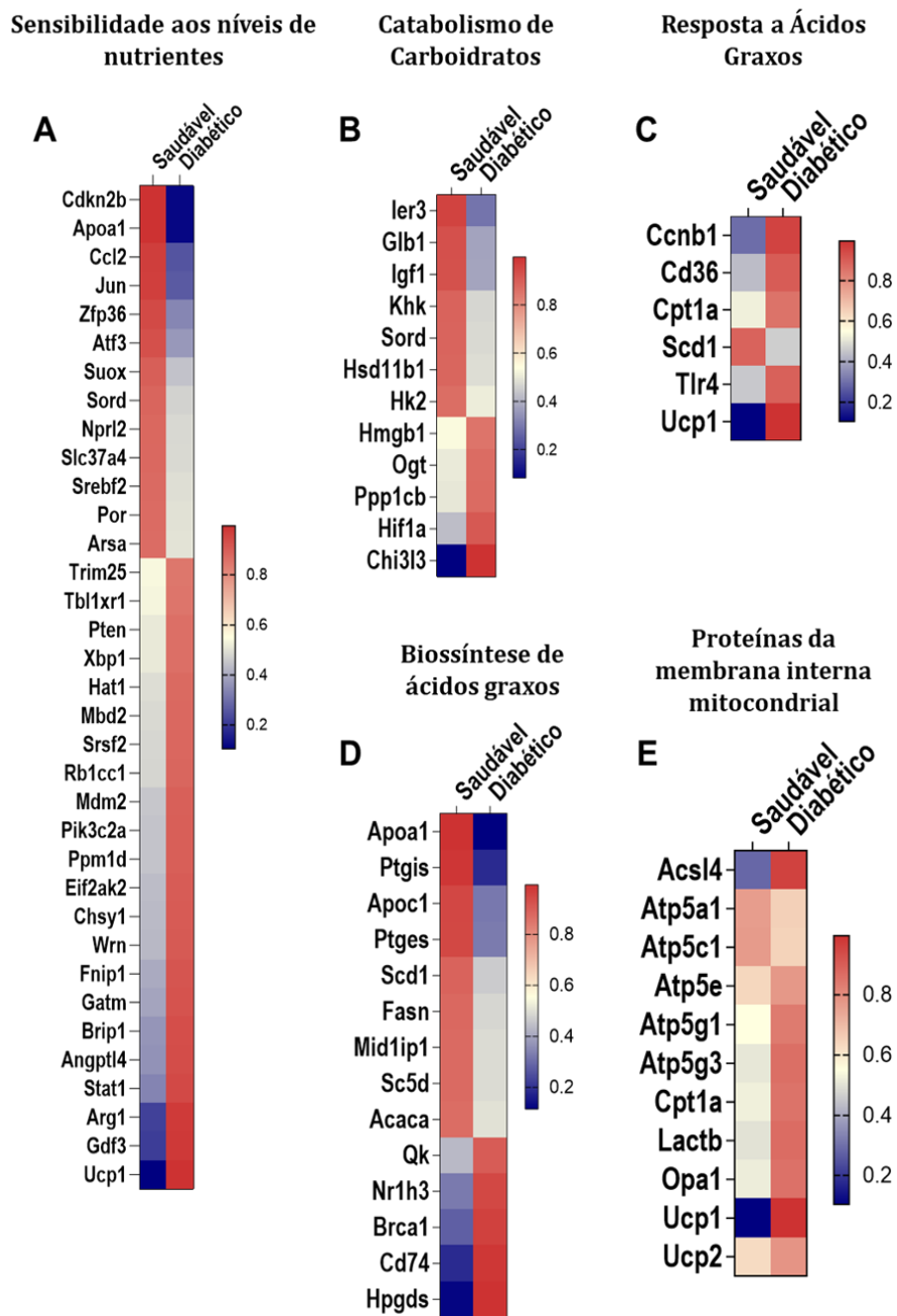


Figura 9. Heatmap de genes ligados a Sensibilidade aos níveis de nutrientes (A), Catabolismo de carboidratos (B), resposta a ácidos graxos (C), Biossíntese de ácidos graxos (D) e Proteínas na membrana interna mitocondrial (E) em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos. Classificação usando banco de dados *Data base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)*. Normalização dos dados pelo dimensionamento do valor de expressão gênica das amostras para uma norma unitária. Tons de vermelho indicam regulação positiva da expressão gênica. Tons de azul indicam regulação negativa da expressão gênica.

Tabela 2. Descrição e valores de expressão gênica e *Fold change* dos genes presentes nos *HeatMap* da figura 9.

Sensibilidade aos níveis de nutrientes					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Angptl4	angiopoietin-like 4	2,00501	5,24607	1,38762	0,00045
Apoa1	apolipoprotein A	7,34249	0,841698	-3,12489	0,0003
Arg1	arginase	151,204	682,895	2,17517	0,00005
Arsa	arylsulfatase A	33,1155	19,0787	-0,795547	0,0002
Atf3	activating transcription factor 3	34,607	13,7455	-1,3321	0,00005
Brip1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	0,71289	1,82739	1,35804	0,00025
Ccl2	chemokine ligand 2	86,2379	22,1972	-1,95795	0,00005
Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	12,1089	1,38737	-3,12564	0,00005
Chsy1	chondroitin sulfate synthase 1	13,6084	28,7067	1,0769	0,00005
Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	5,99412	12,5521	1,06631	0,00005
Fnip1	folliculin interacting protein 1	3,8627	8,8475	1,19566	0,00005
Gatm	glycine amidinotransferase	2,89953	6,87571	1,24569	0,00005
Gdf3	growth differentiation factor 3	0,768485	3,58548	2,22208	0,0001
Hat1	histone aminotransferase 1	17,5977	31,3316	0,832237	0,0011
Jun	jun proto-oncogene	43,8491	11,8405	-1,88881	0,00005
Mbd2	methyl-CpG binding domain protein 2	12,3045	22,3364	0,860219	0,00055
Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	12,3449	24,6261	0,996275	0,0001
Nprl2	nitrogen permease regulator-like 2	16,4576	9,01639	-0,868133	0,00165
Pik3c2a	phosphatidylinositol 3-kinase	1,15889	2,34433	1,01644	0,0007
Por	P450 oxidoreductase	18,5966	10,6021	-0,810697	0,0012
Ppm1d	protein phosphatase 1D magnesium-dependent	2,33116	4,71699	1,01682	0,002
Pten	phosphatase and tensin homolog	5,08072	8,56386	0,753227	0,0012
Rb1cc1	RB1-inducible coiled-coil 1	2,99483	5,55867	0,892267	0,00055
Slc37a4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter)	15,7812	8,66987	-0,864122	0,00055
Sord	sorbitol dehydrogenase	27,3601	14,5393	-0,912113	0,00025
Srebf2	sterol regulatory element binding factor 2	7,71349	4,35217	-0,825647	0,0024
Srsf2	serine/arginine-rich splicing factor 2	72,9094	134,18	0,879994	0,00005
Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	13,563	38,3191	1,49838	0,00005
Suox	sulfite oxidase	5,4155	2,6722	-1,01906	0,00215
Tbl1xr1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	8,29733	13,2374	0,673896	0,00175
Trim25	tripartite motif-containing 25	14,1478	22,3213	0,657844	0,00275
Ucp1	uncoupling protein 1	0,953417	9,14648	3,26204	0,00005
Wrn	Werner syndrome homolog	2,00959	4,29984	1,09738	0,00165
Xbp1	X-box binding protein 1	76,5902	129,261	0,755051	0,00025
Zfp36	zinc finger protein 36	318,617	113,941	-1,48354	0,00005

Catabolismo de Carboidratos					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Chi3l3	chitinase-like 3	17,6383	215,3	3,60957	0,00005
Glb1	galactosidase, beta 1	207,132	83,196	-1,31597	0,00005
Hif1a	hypoxia inducible factor 1α	7,58057	16,4175	1,11485	0,00005
Hk2	hexokinase 2	10,0279	5,88066	-0,76997	0,0013
Hmgb1	high mobility group box 1	57,6494	92,3495	0,6798	0,00125
Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	21,7725	11,8342	-0,879544	0,00255
Ier3	immediate early response 3	109,734	33,1699	-1,72606	0,00005
Igf1	insulin-like growth factor 1	10,9926	4,44999	-1,30466	0,00005
Khk	ketoheksokinase	170,472	89,5149	-0,929332	0,00005
Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	13,5722	23,4278	0,787565	0,00025
Ppp1cb	protein phosphatase 1	17,7529	31,0719	0,807558	0,00025
Sord	sorbitol dehydrogenase	27,3601	14,5393	-0,912113	0,00025

Resposta a Ácidos Graxos					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Ccnb1	cyclin B1	4,602	15,0084	1,70544	0,00005
Cd36	CD36 antigen	138,271	288,829	1,06272	0,00005
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a	22,3866	36,5777	0,708326	0,00095
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	6,93702	3,62071	-0,938043	0,00085
Tlr4	toll-like receptor 4	11,4994	22,67	0,979228	0,00005
Ucp1	uncoupling protein 1	0,95342	9,14648	3,26204	0,00005

Biossíntese de ácidos graxos					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Acaca	acetyl-Coenzyme A carboxylaseα	16,855	9,7623	-0,78788	0,0004
Apoa1	apolipoprotein A-I	7,34249	0,841698	-3,12489	0,0003
Apoc1	apolipoprotein C-I	54,2274	18,3384	-1,56415	0,00085
Bra1	breast cancer 1, early onset	0,55253	1,91471	1,79301	0,00005
Cd74	CD74 antigen	1507,57	7988,7	2,40574	0,00005
Fasn	fatty acid synthase	3,90756	2,15078	-0,861412	0,00105
Hpgds	hematopoietic prostaglandin D synthase	0,13592	1,1155	3,03687	0,0027
Mid1ip1	Mid1 interacting protein 1	53,8469	30,31	-0,829072	0,00305
Nr1h3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	3,85927	11,2842	1,5479	0,0001
Ptges	prostaglandin E synthase	11,158	3,82802	-1,5434	0,00005
Ptgis	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	337,681	63,5011	-2,41081	0,00005
Qk	quaking	11,4976	24,0475	1,06456	0,0003
Sc5d	sterol-C5-desaturase	19,9126	11,2103	-0,828858	0,00075
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	6,93702	3,62071	-0,938043	0,00085

Proteínas do membrana interna da mitocôndria					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Acs14	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	2,41104	8,15707	1,7584	0,1222
Atp5a1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	252,783	216,006	-0,226828	0,2762
Atp5c1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	0,73936	0,622919	-0,247239	0,87865
Atp5e	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	678,505	826,508	0,284669	0,1646
Atp5g1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex	12,9325	19,7004	0,607221	0,3007
Atp5g3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex	201,229	342,11	0,765618	0,00055
Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a	22,3866	36,5777	0,708326	0,00095
Lactb	lactamase beta	6,78129	11,8463	0,804807	0,0047
Opal	optic atrophy 1	1,72156	2,85119	0,727849	0,1697
Ucp1	uncoupling protein 1	0,95342	9,14648	3,26204	0,00005
Ucp2	uncoupling protein 2	293,517	365,771	0,317497	0,15625

De acordo com isso, no presente trabalho, vimos que a expressão da proteína desacopladora mitocondrial *Ucp1* estava aumentada em macrófagos de animais WT de forma dependente de leucotrienos, uma vez que esse aumento não foi observado em animais 5LO^{-/-} diabéticos (FIG.10).

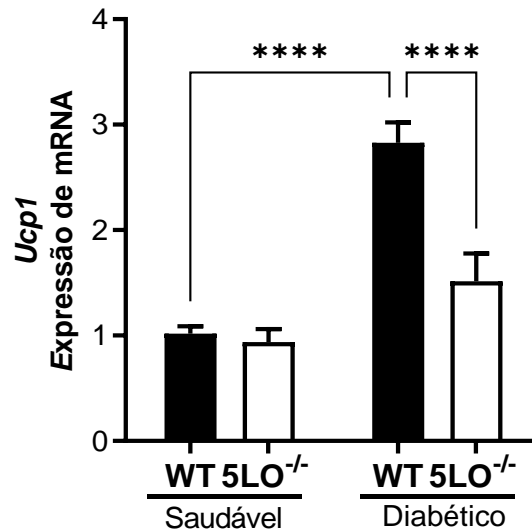


Figura 10. Expressão gênica de *Ucp1* em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos. Macrófagos foram isolados do lavado peritoneal de camundongos WT e 5LO^{-/-} e processados para análise de expressão gênica. $n = 3$ a 5 . Média \pm SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Interação entre leucotrienos e diabetes: (**); Diabetes: (**); Leucotrienos: (**). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****). Figura representativa de três experimentos independentes.

Como as proteínas desacopladoras promovem aumento do consumo de oxigênio em células que fazem uso desta via, avaliamos então o metabolismo oxidativo de macrófagos dos camundongos diabéticos (FIG 11). Macrófagos derivados de animais diabéticos WT apresentaram maior respiração mitocondrial basal em relação aos saudáveis, esse aumento se mostrou dependente de leucotrienos uma vez que macrófagos de animais diabéticos 5LO^{-/-} apresentaram menor respiração basal quando comparado às células de animais diabéticos WT (FIG.11A).

Após a inibição da síntese de ATP com a droga Oligomicina, houve queda no consumo de oxigênio por macrófagos de animais WT diabéticos, quando comparado ao correspondente saudável. Isto indica maior produção de ATP por células de animais WT diabéticos que aqueles saudáveis (FIG.11B). A droga CCCP mimetiza

uma demanda energética máxima a cadeia respiratória por promover desacoplamento respiratório. Portanto essa é uma droga que induz o consumo máximo de oxigênio. No contexto do diabetes, macrófagos de animais $5LO^{-/}$ apresentaram menor respiração máxima quando comparado aos macrófagos de WT, os quais tiveram os níveis de respiração máxima semelhante aos macrófagos de animais saudáveis (FIG.11C). Isso sugere que a presença de leucotrienos é importante na captação rápida de recursos em resposta ao desafio metabólico severo. Embora sejam capazes de atingir grandes taxas de atividade oxidativa, macrófagos de animais WT diabéticos possuem menor capacidade de produzir ATP extra em caso de demanda energética repentina em relação aos saudáveis(FIG.11D). É interessante notar que mesmo em macrófagos de animais saudáveis, leucotrienos apresentem papel em estimular maior capacidade de reserva, sendo que esta capacidade é significativamente diminuída no contexto de diabetes.

Por fim, as drogas Rotenona e Antimicina A_7 inutilizam a cadeia de transporte de elétrons (CTE) e permitem avaliar o parâmetro de vazamento de prótons, calculado a partir da respiração independente da síntese de ATP. Macrófagos de animais WT diabéticos apresentaram maior vazamento de prótons comparado aos macrófagos de animais saudáveis (FIG.11E). No contexto de diabetes, os leucotrienos são importantes na indução desse fenômeno, já que os macrófagos de animais $5LO^{-/}$ apresentaram menor taxa de vazamento de prótons com relação aos WT. Este resultado é bastante relevante e confirma de maneira funcional o papel da proteína desacopladora UCP1 e a elevada expressão gênica dessa em macrófagos de animais WT diabéticos.

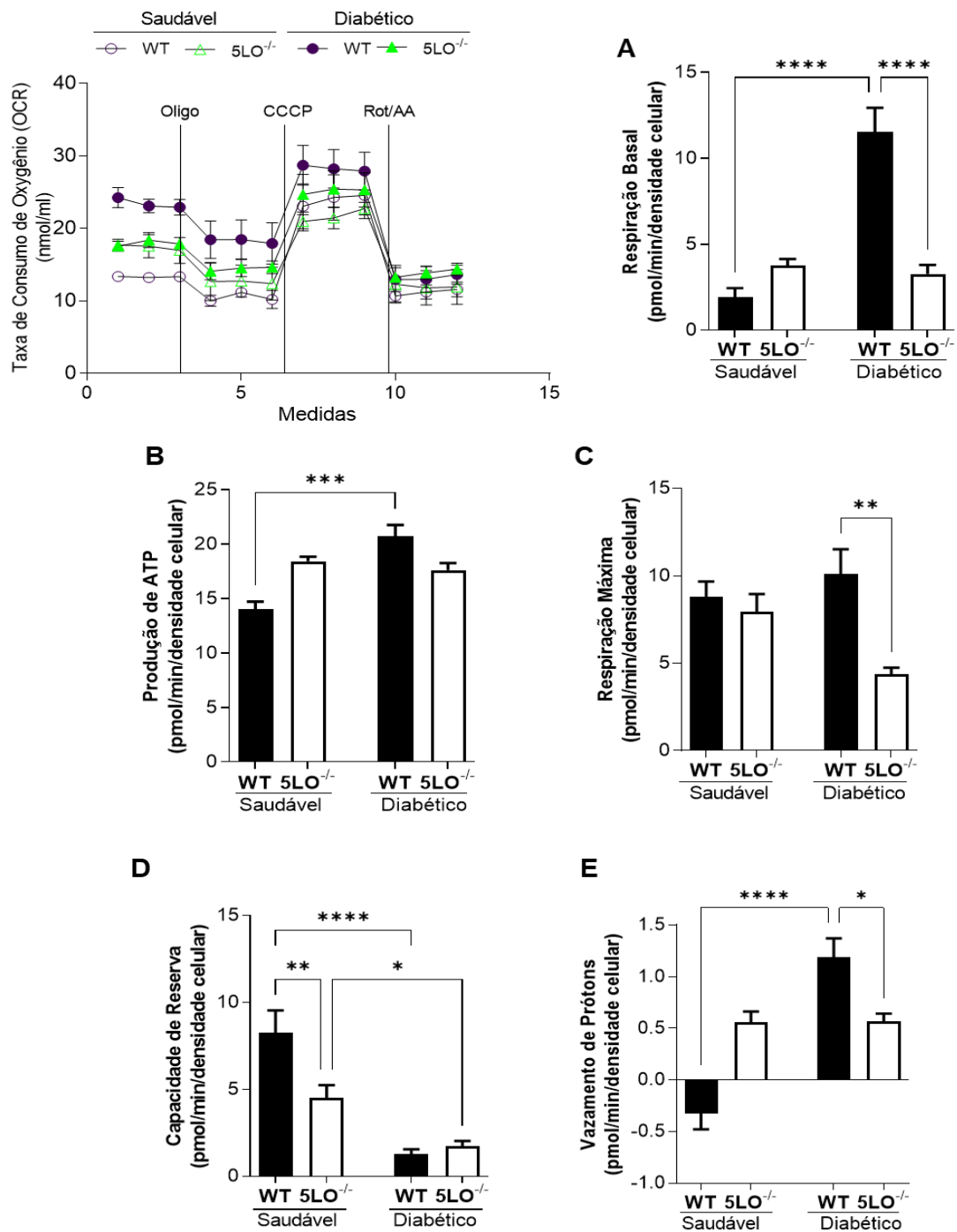


Figura 11. Respiração mitocondrial de macrófagos e camundongos saudáveis e diabéticos. Ensaio Mitostress (Seahorse) em macrófagos peritoneais de animais WT e 5LO^{-/-}. Oligomicina (inibidor da ATP sintase), carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP, ionóforo), Rotenona e Antimicina (Rot/AA, inibidores do complexo I e III da CTE, respectivamente) n =5 a 6. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Interação entre leucotrienos e diabetes: (**) para Capacidade de Reserva(D), (***) para Produção de ATP (B), (****) para Respiração Basal(A) e Vazamento de Prótons (E); Diabetes: (**) para Produção de ATP, (****) para Respiração Basal, Capacidade de Reserva(D) e Vazamento de Prótons(E), Leucotrienos: (*) para Respiração Máxima(C) e Capacidade de Reserva(A), (**) para Respiração Basal (A). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****). Figura representativa de dois experimentos independentes.

4.3. A via de oxidação de ácidos graxos tem papel importante na produção de citocinas em macrófagos de animais diabéticos

Como já descrito anteriormente, UCP1 está ligada a via de resposta a presença de ácidos graxos (FIG.9C), assim como alta atividade oxidativa mitocondrial em macrófagos de animais diabéticos (FIG.11). Diante disso, decidimos bloquear a proteína CPT1 α utilizando a droga Etomoxir. CPT1 α é responsável pela captação de Acyl-CoA derivada de ácidos graxos na mitocôndria.

Em animais diabéticos, o tratamento com Etomoxir reduziu significativamente a expressão gênica da proteína *Ucp1* em relação as células não tratadas (FIG.12). Isto reforça que o catabolismo de ácidos graxos está estimulando a atividade mitocondrial e, portanto, desacoplando a CTE via UCP1.

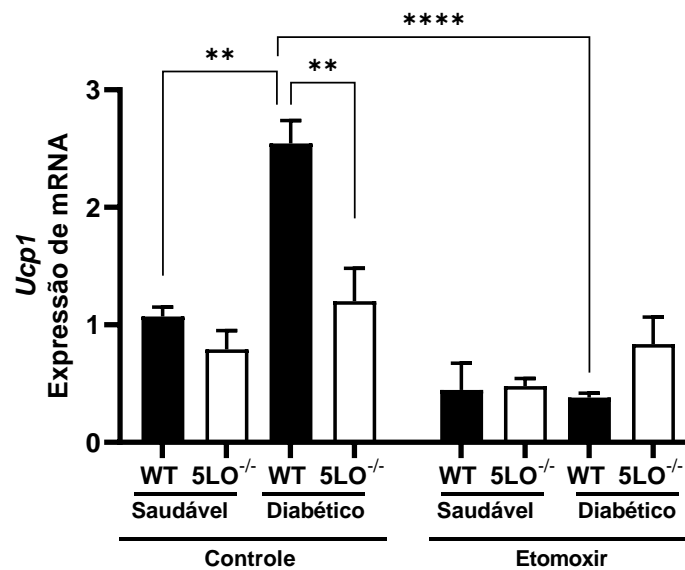


Figura 12. Expressão gênica de *Ucp1* em animais diabéticos e saudáveis diante do tratamento com Etomoxir. Macrófagos peritoneais de animais WT e 5LO^{-/-} foram tratados com Etomoxir por 4h. $n = 3$ a 6 . Média \pm SEM. ANOVA de três fatores: Etomoxir, Diabetes e Leucotrienos. Fonte de variação: Etomoxir: (****); Diabetes (**); Leucotrienos(ns); Etomoxir x Diabetes (*); Etomoxir x Leucotrienos(**); Diabetes x Leucotrienos (ns); Etomoxir x Diabetes x Leucotrienos (*). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).

Uma das funções da ativação de *Ucp1* na mitocôndria é a regulação do potencial de membrana e consequente redução da produção de EROs mitocondriais (ECHTAY et al., 2002; ZHAO et al., 2019). Concordando com isto, a mensuração de EROs mitocondrial de macrófagos mostrou que a condição de diabetes é significativa para o

aumento de EROs, apenas em animais WT(FIG.13A).

A análise de genes ligados a resposta ao estresse oxidativo mostrou que enzimas relacionadas ao controle de EROs como SOD1, SOD2, Gpx1, por exemplo, não foram reguladas em macrófagos na condição de diabetes. Contudo, *Ucp1* está presente nessa via com alta regulação positiva no diabetes (FIG.13B). Os valores de expressão gênica individuais estão apresentados na tabela 3.

Somado a isto, o tratamento com Etomoxir induziu aumento na expressão gênica de Gpx1 em macrófagos de animais diabéticos em relação ao mesmo grupo não tratado (FIG.13C). Estes resultados sugerem que o papel de UCP1 em regular a produção de EROs mitocondrial compensa a expressão de demais genes ligados a esse processo. Isto explicaria o aumento de Gpx1 em animais WT diante do bloqueio da captação de Acyl-CoA, uma vez que foi necessária uma compensação da função de controle de EROs diante da diminuição de *Ucp1*.

Resposta ao Estresse Oxidativo

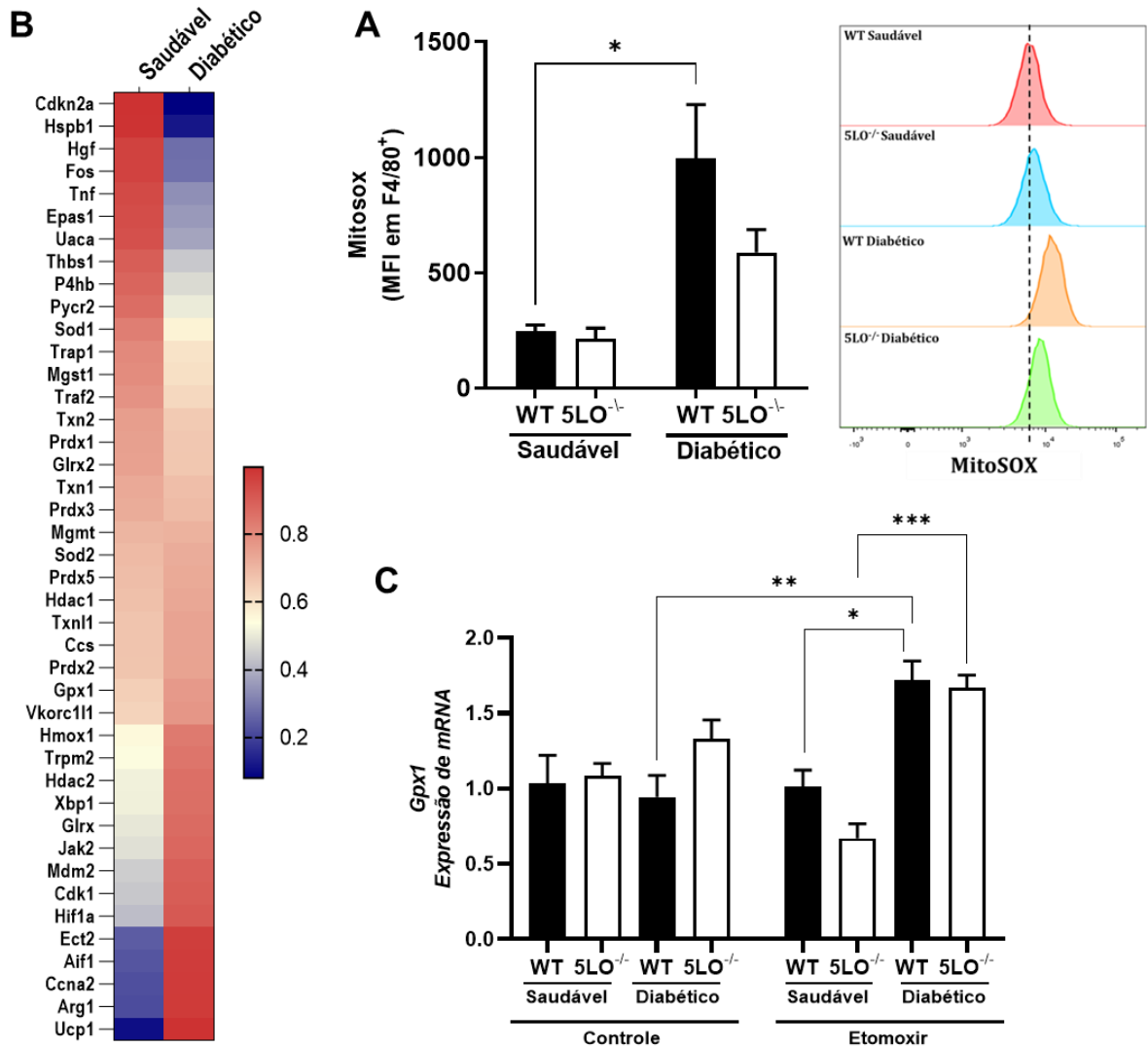


Figura 13. Heatmap de Resposta ao Estresse Oxidativo (A), a produção de EROs mitocondrial (B) e Expressão gênica de *Gpx1*(C) em macrófagos de animais saudáveis e diabéticos. (A) MitoSOX para mensuração de EROs mitocondrial por Média de intensidade de fluorescência (MFI). $n=3$ a 6 . Média \pm SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Diabetes (). (B) Classificação via banco de dados *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)*. Normalização dos dados pelo dimensionamento do valor de expressão gênica das amostras para uma norma unitária. Tons de vermelho indicam regulação positiva da expressão gênica. Tons de azul indicam regulação negativa da expressão gênica. (C) Macrófagos peritoneais de animais WT e $5LO^{-/-}$ foram tratados com Etomoxir por 4h. ANOVA de três fatores: Etomoxir, Diabetes e Leucotrienos. Fonte de variação: Diabetes (****); Etomoxir x Diabetes (***); Etomoxir x Leucotrienos (*). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).**

Tabela 3. Descrição e valores de expressão gênica e *Fold change* dos genes presentes nos *HeatMap* da figura 13.

Resposta ao Estresse Oxidativo					
Gene	Nome do Gene	Expressão Gênica		Fold change	p Value
		Saudável	Diabético		
Aif1	allograft inflammatory factor 1	38,4882	160,82	2,06296	0,00005
Arg1	arginase, liver	151,204	682,895	2,17517	0,00005
Ccna2	cyclin A2	2,46704	10,8755	2,14022	0,0005
Ccs	copper chaperone for superoxide dismutase	29,9086	33,2551	0,153014	0,53285
Cdk1	cyclin-dependent kinase 1	6,13485	12,627	1,04142	0,00015
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	12,3651	0,994064	-3,63679	0,0003
Ect2	ect2 oncogene	0,812241	3,23032	1,9917	0,0003
Epas1	endothelial PAS domain protein 1	5,90954	2,23877	-1,40034	0,00005
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	196,863	57,5648	-1,77393	0,00005
Glrx	glutaredoxin	40,8367	71,7485	0,81308	0,00025
Glrx2	glutaredoxin 2	10,3466	9,16478	-0,174984	0,47575
Gpx1	glutathione peroxidase 1	7299,86	8656,52	0,24592	0,3744
Hdac1	histone deacetylase 1	15,1655	16,4219	0,114829	0,64025
Hdac2	histone deacetylase 2	6,4772	10,8573	0,74522	0,0099
Hgf	hepatocyte growth factor	1,75457	0,504974	-1,79684	0,00095
Hif1a	hypoxia inducible factor 1 α	7,58057	16,4175	1,11485	0,00005
Hmox1	heme oxygenase 1	99,6735	151,145	0,600654	0,0047
Hspb1	heat shock protein 1	7,31237	0,870251	-3,07084	0,0001
Jak2	Janus kinase 2	4,35177	7,91863	0,863648	0,0007
Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	12,3449	24,6261	0,996275	0,0001
Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	15,3441	15,4901	0,0136634	0,96755
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	568,891	435,184	-0,386528	0,05875
P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	517,994	276,731	-0,904452	0,00005
Prdx1	peroxiredoxin 1	563,915	497,445	-0,18094	0,38815
Prdx2	peroxiredoxin 2	225,006	250,581	0,155313	0,4519
Prdx3	peroxiredoxin 3	120,019	114,36	-0,0696819	0,7407
Prdx5	peroxiredoxin 5	1772,22	1882,87	0,0873705	0,6823
Pycr2	pyrroline-5-carboxylate reductase	29,0896	16,8853	-0,784733	0,003
Sod1	superoxide dismutase 1	408,702	279,756	-0,54688	0,00965
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	31,7045	33,076	0,0610996	0,77615
Thbs1	thrombospondin 1	592,742	290,006	-1,03132	0,00005
Tnf	tumor necrosis factor	1,43857	0,51263	-1,48864	0,0144
Traf2	TNF receptor-associated factor 2	13,8088	11,053	-0,321149	0,17685
Trap1	TNF receptor-associated protein 1	28,7012	21,4803	-0,418099	0,0607
Trpm2	transient receptor potential cation channel, M2	4,49711	7,15057	0,66906	0,0056
Txn1	thioredoxin 1	342,64	320,403	-0,0968044	0,63965
Txn2	thioredoxin 2	203,933	177,297	-0,201928	0,3238
Txn1l	thioredoxin-like 1	22,7311	25,2252	0,150198	0,49645
Uaca	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	2,21546	0,891165	-1,31384	0,0005
Ucp1	uncoupling protein 1	0,953417	9,14648	3,26204	0,00005
Vkorc1l1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1	1,00474	1,22033	0,280454	0,66985
Xbp1	X-box binding protein 1	76,5902	129,261	0,755051	0,00025

Nesse sentido, nos perguntamos como a diminuição na expressão de *Ucp1*, causada pelo tratamento com Etomoxir, e a conseqüente redução nas funções dessa proteína na bioenergética mitocondrial, afetariam a função do macrófago. Para isso, avaliamos a expressão gênica para marcadores de fenótipo e dosamos as citocinas presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos diabéticos e saudáveis, WT e 5LO^{-/-}, tratados ou não com Etomoxir.

A produção de citocinas IL-1 β , IL-10 e IL-12 foi maior em macrófagos de animais WT diabéticos em relação a animais saudáveis. Contudo o bloqueio farmacológico da captação de Acyl-CoA derivado de ácidos graxos pela mitocôndria diminuiu significativamente a produção dessas citocinas em animais WT diabéticos, o que aconteceu de forma menos pronunciada nos macrófagos de animais 5LO^{-/-} diabéticos (FIG.14A, B e C). Isto sugere que, de certa forma, o metabolismo mitocondrial de Acyl-CoA derivado de lipídeos é importante para a produção dessas citocinas, que estão diretamente ligadas a função do macrófago.

Curiosamente, a expressão gênica de *Nos2* aumentou demasiadamente diante do tratamento com Etomoxir. A expressão desse marcador aumentou ainda mais em macrófagos de animais WT diabéticos tratados quando comparado ao mesmo grupo não tratado. Embora o aumento numérico da expressão com o tratamento tenha ocorrido em todos os grupos, o padrão de aumento dependente de leucotrienos nos animais diabéticos permaneceu (FIG.14D).

Em contrapartida, o oposto ocorreu na expressão gênica de *Arg1* diante do tratamento com Etomoxir. Macrófagos não tratados de animais WT diabéticos apresentavam maior expressão de *Arg1* em relação ao mesmo grupo saudável, esse aumento foi perdido diante do tratamento com Etomoxir. O tratamento estimulou maior expressão de *Arg1* em macrófagos de animais 5LO^{-/-} diabéticos quando comparados com macrófagos WT diabético (FIG.14E).

O resultado observado em *Nos2* e *Arg1* sob o tratamento com Etomoxir sugere que a alteração metabólica causada pela ação da droga pode levar a uma reprogramação metabólica em função da redução da oxidação de ácidos graxos. O aumento de *Nos2* pode ser um reflexo indireto da diminuição da função antioxidante de UCP1. Além disso, as enzimas iNos e Arginase1 competem pelo mesmo substrato, o aminoácido arginina, o que explicaria o aumento da expressão de *Nos2* e diminuição da expressão de *Arg1* (SCHREIBER et al., 2009).

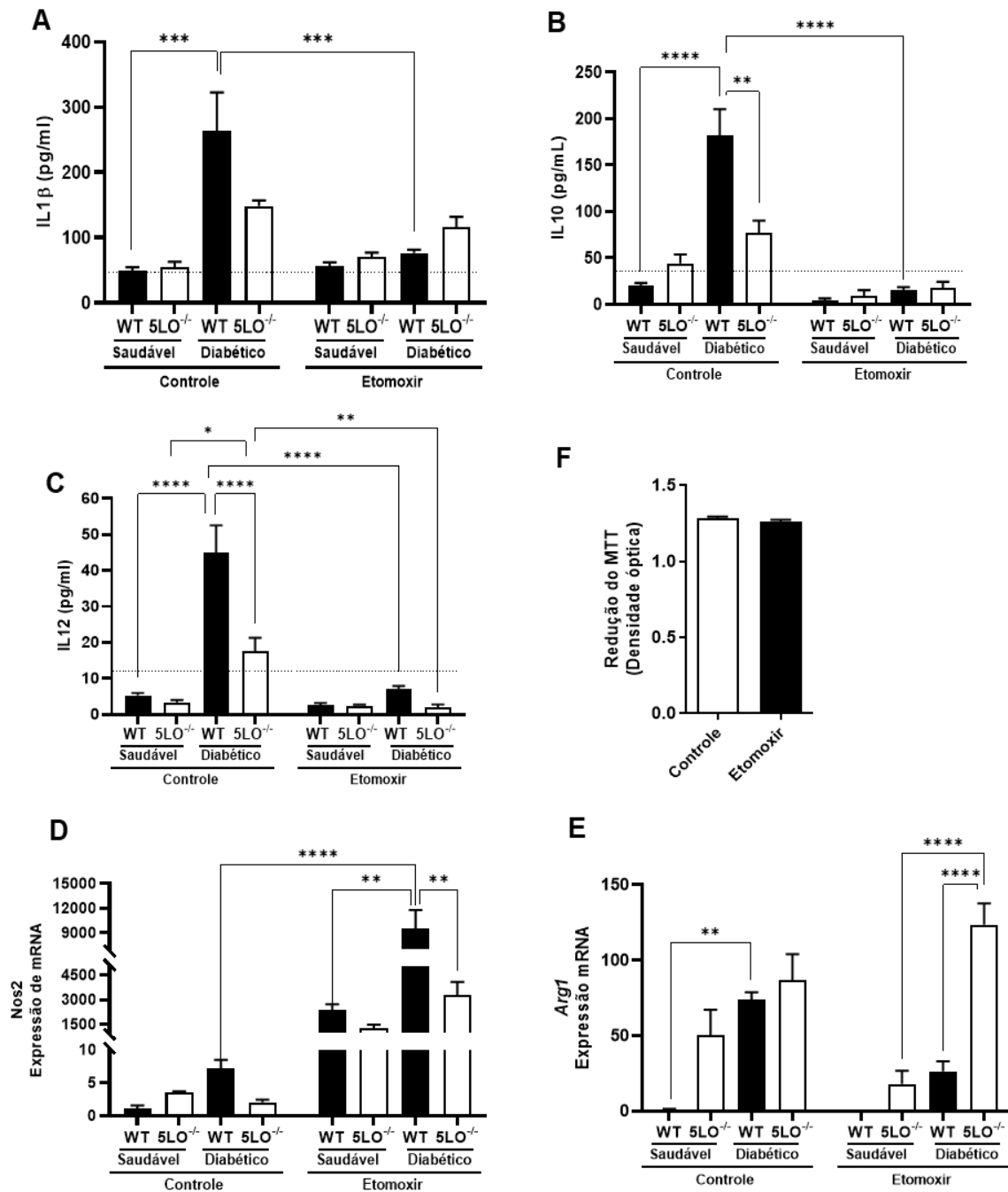


Figura 14. . Produção de IL1 β , IL-12 e IL-10 e expressão gênica *Nos2* e *Arg1* por macrófagos de animais saudáveis e diabéticos e frente ao tratamento com Etomoxir. Macrófagos peritoneais de animais WT e 5LO^{-/-} tratados por 4h com Etomoxir. Linhas tracejadas indicam o limite de detecção= 4 a 6.(A-E) Média \pm SEM.ANOVA de três fatores: Etomoxir, Diabetes e Leucotrienos. Fonte de variação: Etomoxir (*) para IL-1 β (A),(***) para IL-10(B),IL-12(C) e *Nos2*(D); Diabetes(**) para *Nos2*(D), (***) para IL-10(B), (***) para IL-1 β (A), IL-12(C) e *Arg1*(E); Leucotrienos (*) para *Nos2*(D), (***) para IL-1 β (A), IL-12(C) e *Arg1*(E); Etomoxir x Diabetes (**)para IL-1 β (A),IL-10(B) e *Nos2*(D), (***) para IL-12(C); Etomoxir x Leucotrienos(*) para *Nos2*(D) (**) para IL-12; Diabetes x Leucotrienos (*) para IL-10(B), (***) IL-12(C); Etomoxir x Diabetes x Leucotrienos(*) para IL-10(B), (**) para *Arg1*(E) e IL-12(C).(F)Ensaio de MTT não significativo em teste t não pareado. *p values*: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).

É importante ressaltar que os efeitos reportados pelo Etomoxir não aconteceram devido à toxicidade desta droga sobre as células. Não houve redução da viabilidade das células diante do tratamento com Etomoxir, conforme apresentado no ensaio de reação do MTT (FIG.14F).

4.4. Metabólitos da lipólise induzem a expressão proteica de UCP1 em macrófagos de maneira dependente de LTB4.

Recentemente, RAMALHO e colaboradores, 2019 demonstraram que LTB4 está associado a uma acentuada hiperlipidemia em camundongos diabéticos, sugerindo que esses lipídeos circulantes seriam uma fonte de ácidos graxos para os macrófagos peritoneais (RAMALHO et al., 2019). O trabalho ainda sugere que a ligação de LTB4 ao receptor BLT1 estimulava macrófagos de animais diabéticos a captarem lipídeos do meio extracelular via receptor CD36.

Nesse sentido, nos questionamos em condições de alta concentração de lipídeos, a ativação de UCP1 em macrófagos seria modulada por LTB4. Para isto, realizamos um ensaio *in vitro* em que induzimos lipólise em adipócitos derivados de células 3T3-L1 e adicionamos o sobrenadante das células lipolíticas em BMDMs e macrófagos peritoneais de camundongos WT e BLT1^{-/-}.

O agonista do adrenoreceptor $\beta 3$ (CL-316243) foi adicionado as células 3T3-L1 para estimular a lipólise. Os ensaios de padronização mostraram que após 6 horas de estímulo por CL-316243, o nível de glicerol livre no sobrenadante atinge um patamar (Figura 15A). A lipólise foi mensurada pelos níveis de glicerol e não por níveis de ácidos graxos livres devido a chance de reesterificação de ácidos graxos livres pelos próprios adipócitos após a lipólise. (JENSEN; EKBERG; LANDAU, 2001; SCHWEIGER et al., 2014).

Os resultados mostraram que os metabólitos da lipólise foram importantes para promover a expressão proteica de UCP1 em condições de alta concentração de lipídeos, de maneira dependente da presença do receptor de LTB4. (FIG.15B e C). Isto sugere que a lipólise em adipócitos promove um estado de ativação LTB4-dependente em macrófagos o qual promove o aumento da expressão proteica de UCP1. Além disso, a expressão reduzida de UCP1 nos macrófagos BLT1^{-/-} sugere que a lipólise em adipócitos também pode ser uma fonte de LTB4.

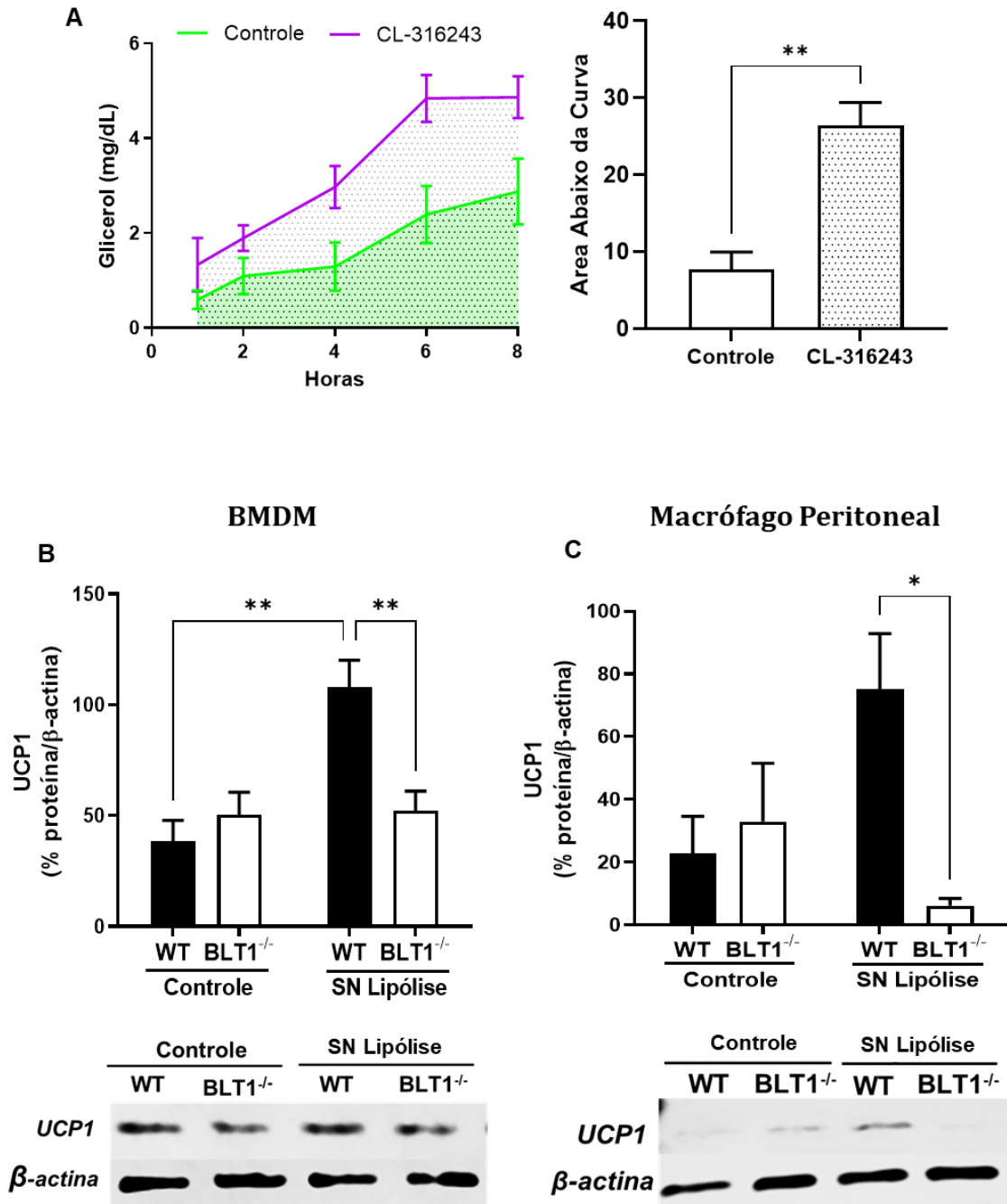


Figura 15. Padronização de ensaio de Lipólise (A) e Expressão proteica de UCP1 em BMDM (B) e macrófagos peritoneais (MOP) (C) de animais saudáveis.(A) CL-316243 (10µm),foi utilizado para induzir a lipólise em adipócitos 3T3-L1. Lipólise foi mensurada pela quantidade de glicerol. Area abaixo da Curva em Teste t não-pareado ,n= 3 a 6 por hora.(B) e (C) Células incubadas com sobrenadante de lipólise (SN Lipólise) posteriormente processadas em tampão de lise para Western blot. Compensação da densimetria de UCP1 pela β-Actina correspondente. n= 3 a 6 (A), n= 3 (B) Média ± SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e diabetes. Fonte de variação: Interação entre leucotrienos e diabetes (*) para UCP1 BMDM (B) e UCP1 MOP (C); Diabetes: (**) para UCP1 BMDM (B). *p values*: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).

Esses resultados corroboram aqueles de RAMALHO e colaboradores, 2019 , já que neste os autores mostram que camundongos diabéticos tratados com antagonista de BLT1 (U75302) reduziram o acúmulo de lipídeos, o metabolismo oxidativo e expressão de *Ucp1* em macrófagos. Além disso, no mesmo trabalho, a deficiência de UCP1 em macrófagos reduziu o metabolismo oxidativo induzido por diabetes, indicando que a UCP1 é fortemente necessária para este estado metabólico.

4.5. Leucotrienos induzem inflamação no tecido adiposo epididimal de animais diabéticos

Com os resultados anteriores, entendermos o papel da lipólise em promover atividade de UCP1 e conseqüentemente a ativação de macrófagos, de maneira LTB₄-dependente. Levando em consideração a grande perda de tecido adiposo presente nos no DT1, nos perguntamos se essa perda estaria associada não apenas a característica catabólica da doença, mas também a inflamação crônica de baixo grau intensificada por leucotrienos.

Citocinas pró-inflamatórias dosadas no tecido adiposo epididimal mostraram que a condição de diabetes aumenta a produção de IL-12, TNF- α , IL-6 e MCP-1 em animais WT em relação ao saudável, o que não foi observado em animais 5LO^{-/-} (FIG.16A-D). Além disso, o aumento de IL-12 e TNF- α em animais diabéticos se mostrou dependente de leucotrienos. (FIG.16 A e B). Essa característica inflamatória não foi observada no tecido adiposo subcutâneo (FIG.16 E e F).

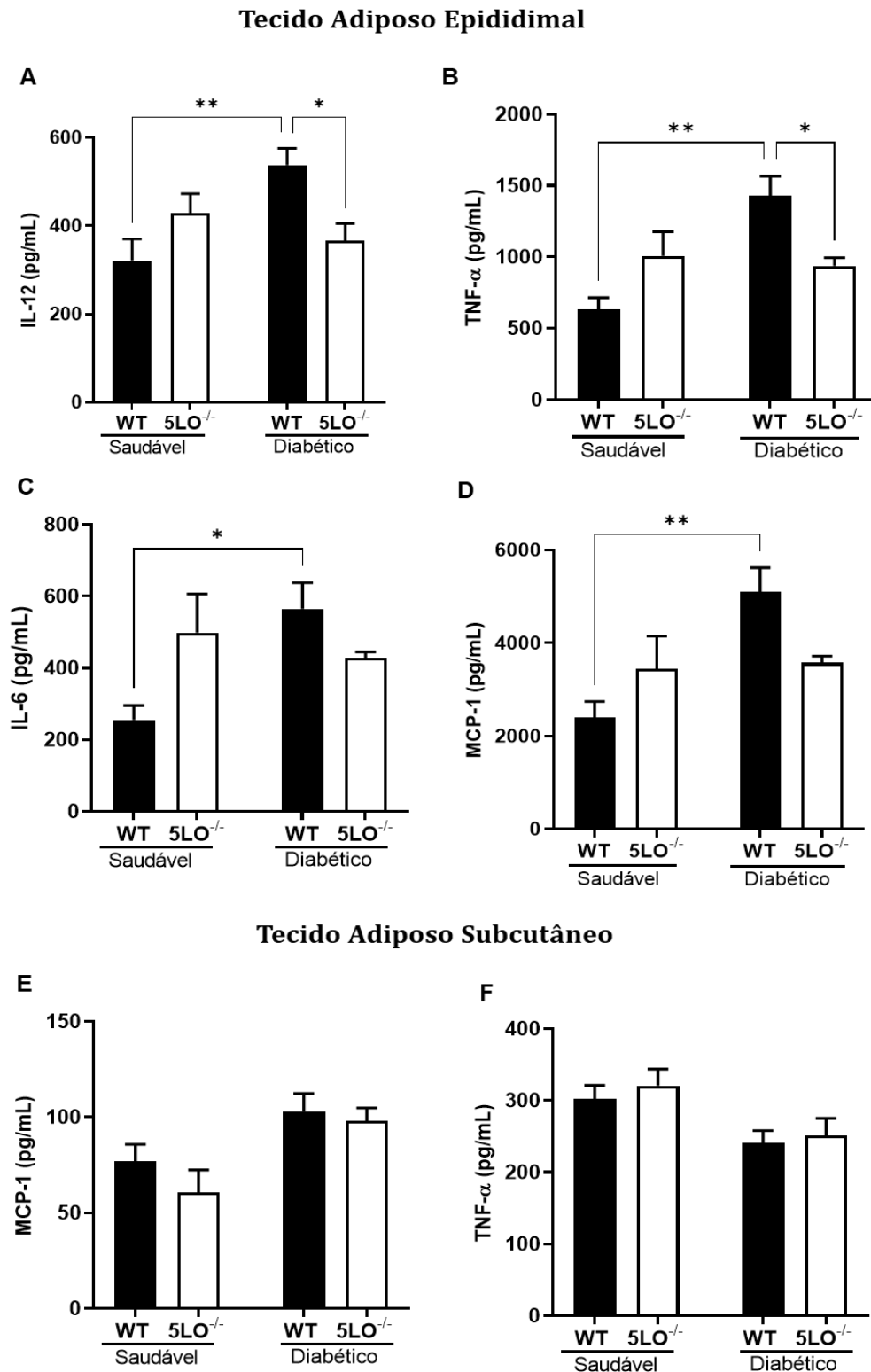


Figura 16. Produção de IL-12, TNF- α , IL-6 e MCP-1 pelo tecido adiposo epididimal(A-D) e subcutâneo(E e F) de animais saudáveis e diabéticos. Dosagem de IL-12, TNF- α , IL-6 e MCP-1 na proteína do tecido adiposo epididimal e subcutâneo de animais WT e 5LO^{-/-} $n=6$ a 8. Média \pm SEM. ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e Diabetes. Fonte de variação: Interação Diabetes e Leucotrienos:(*) para IL-6(C) e MCP-1(D), (**) para IL-12(A) e TNF- α (B); Diabetes: (*) para TNF- α (B) e IL-6(C), (**) para MCP-1(E) e TNF- α (F). p values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).. Figura representativa de dois experimentos independentes.

A partir desse dado, buscamos entender se a inflamação no tecido adiposo epididimal poderia estar associada à perda de adiposidade. Para isso, avaliamos o volume de tecido adiposo epididimal de cada animal em relação ao peso corporal. Embora a perda de tecido adiposo no DT1 seja explicada pela baixa concentração ou total ausência de insulina (CLELAND et al., 2013; MICHAEL et al., 2002), a ausência dos leucotrienos nos animais diabéticos amenizou a perda de tecido adiposo epididimal (TAE) quando comparada à perda pronunciada observada nos animais WT diabéticos (FIG.17A). Animais 5LO^{-/-} são naturalmente menores que animais WT, por esse motivo a gordura epididimal foi compensada pelo peso corporal individualmente.

Em análise histológica do tecido adiposo epididimal, foi nítida a diminuição qualitativa e quantitativa do tamanho dos adipócitos de animais diabéticos (FIG.17B e C). A presença de infiltrado celular também foi observada nos cortes histológicos dos camundongos diabéticos corroborando os resultados de dosagem de citocinas nesse tecido.

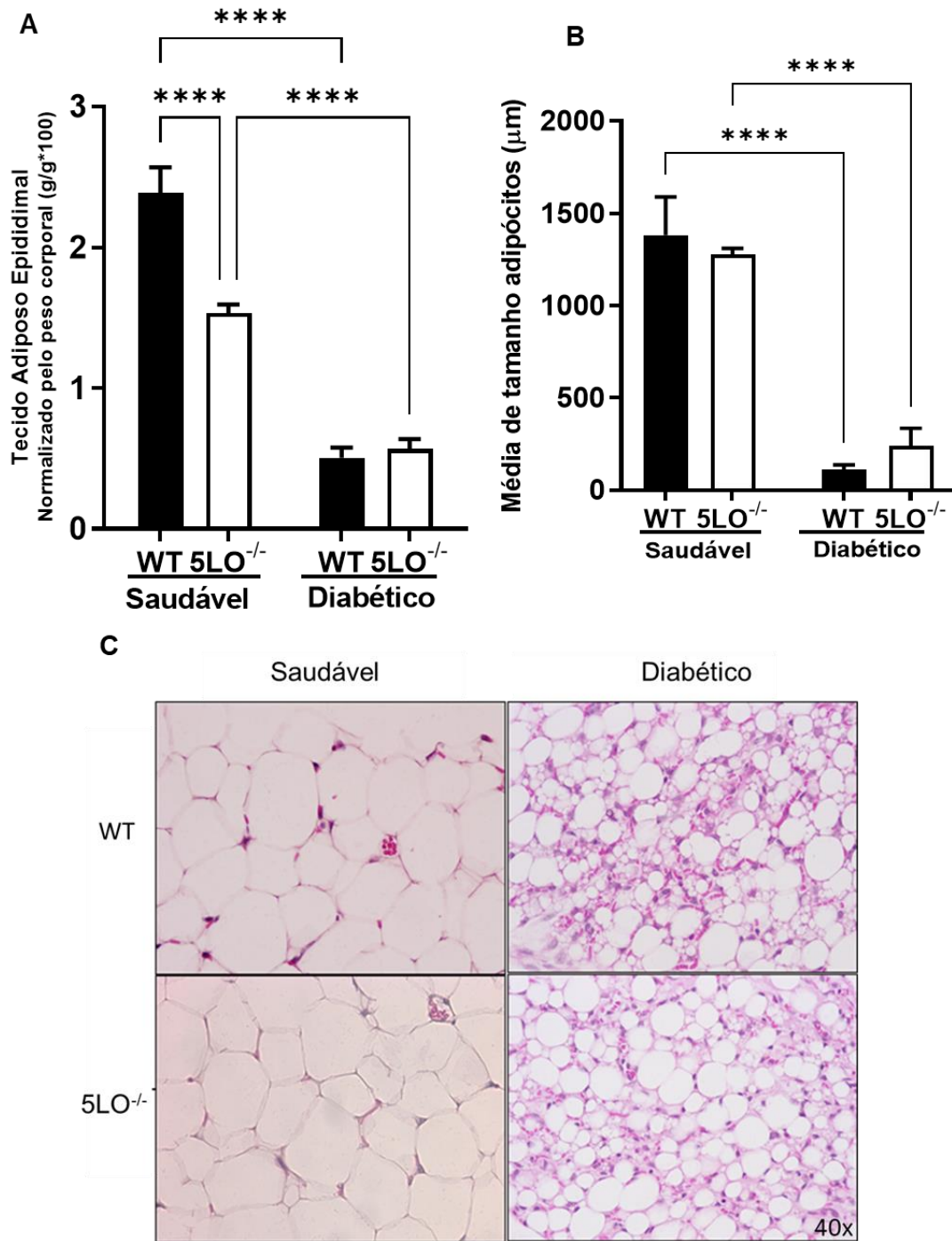


Figura 17. Perda de tecido epididimal (A) e histologia do tecido adiposo epididimal (B e C) de animais saudáveis e diabéticos. (A) Diminuição do tecido adiposo em relação ao peso do animal ((grama TAE / grama corporal)*100) WT e 5LO^{-/-} **(B)** Corte histológico de tecido adiposo epididimal WT e 5LO^{-/-}-Aumento 40x em HE. **(C)** Média de tamanho dos adipócitos nos cortes histológicos medido pelo *software ImageJ – Adiposoft*. ^{-/-} n= 4 a 6. Média ± SEM ANOVA de dois fatores: Leucotrienos e Diabetes. Fonte de variação: Interação Diabetes e Leucotrienos:(***) para TAE(A); Diabetes: (****) para TAE(A) e Média do tamanho (C) ;Leucotrienos:(**) para TAE(A) . *p values*: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****). Figura representativa de três experimentos independentes.

A perda do tecido adiposo no diabetes reflete a condição corporal dos animais. A partir do quinto dia do estabelecimento do quadro de hiperglicemia, os camundongos diabéticos apresentaram menor ganho de massa corporal comparado aos camundongos saudáveis. Dentre os diabéticos, os animais WT foram os que apresentaram menor ganho de peso em relação aos saudáveis a partir do 8. Já os animais 5LO^{-/-} diabéticos apresentaram maior ganho de massa corporal quando comparados aos animais WT diabéticos, no dia 11 (FIG.18A).

Para retirar o viés da quantidade de alimento ingerido, o parâmetro consumo de alimento também foi analisado e normalizado pelo peso dos camundongos. Camundongos diabéticos apresentaram hiperfagia com relação aos saudáveis sendo que, animais WT diabéticos consumiram mais ração que o saudável a partir do dia 6 do protocolo de hiperglicemia, enquanto os 5LO^{-/-} diabéticos consumiram mais ração em relação ao saudável a partir do dia 9 (FIG18B). Dentre os diabéticos, aparentemente, o consumo de alimento foi menor em camundongos 5LO^{-/-}. Isso sugere o envolvimento dos leucotrienos na perda de massa corporal na condição de hiperglicemia, de forma independente do consumo de ração.

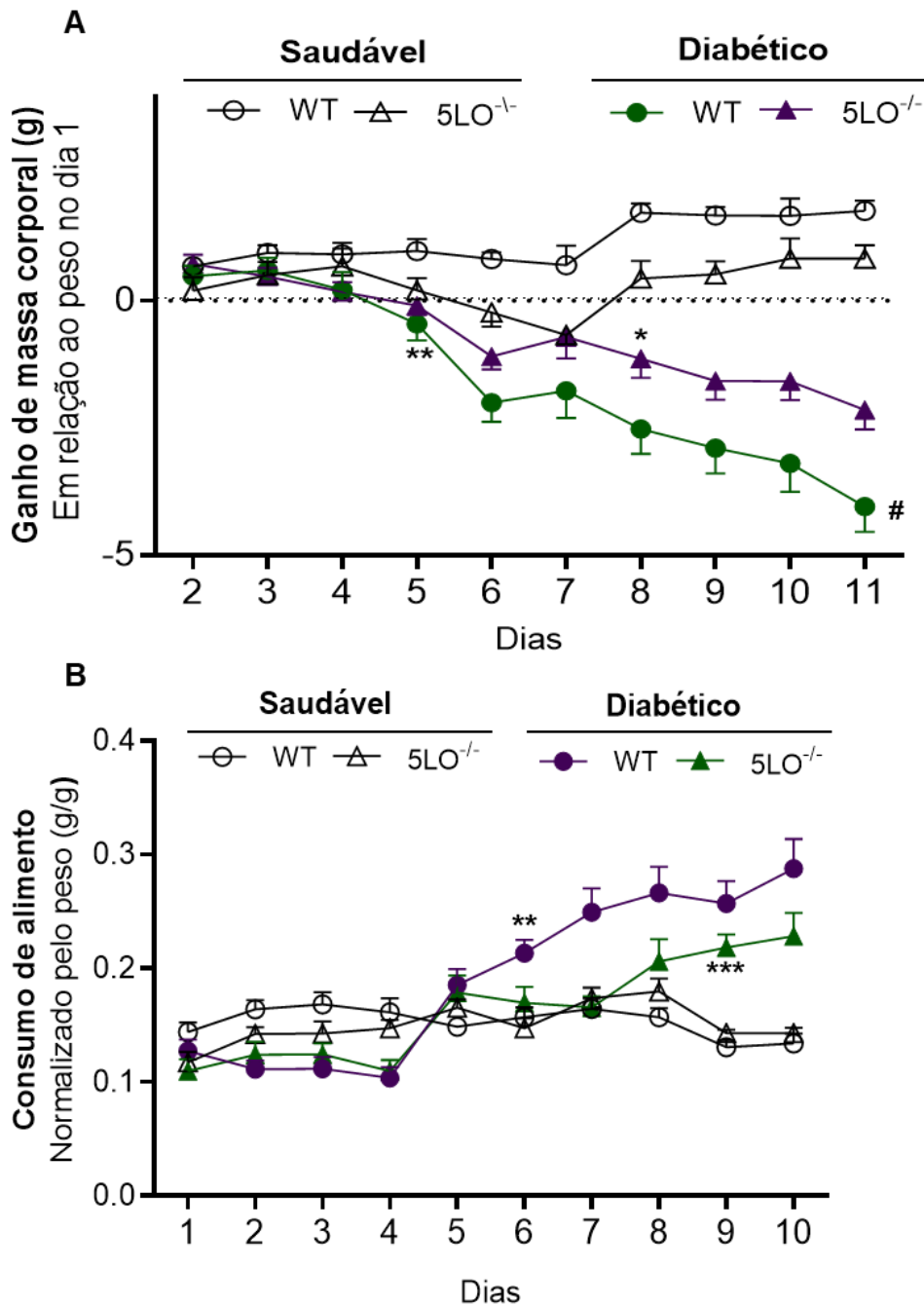


Figura 18. Ganho de Massa Corporal(A) e Consumo de alimento(B) de camundongos saudáveis e diabéticos. (A) Ganho de massa de camundongos WT e 5LO^{-/-} relativo à diferença de peso no dia 1. *n*=15 a 27, somando três experimentos independentes. (B) O consumo de ração diário foi calculado com base na diferença do dia anterior. *N* = 7 a 11 somando dois experimentos independentes. Média±SEM. Análise estatística de efeito misto. Fatores: Interação (***) para Ganho de Peso (A) e Consumo de alimento (B); Dias (****) para Ganho de peso(A) e Consumo de alimento(B); 0 Leucotrienos (***) para Consumo de alimento (B) e (****) para Ganho de peso(A). *p* values: 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002(***), < 0.0001 (****).; #*p*< 0.05 quando comparado ao 5LO^{-/-} diabético.

Em resumo, os dados apresentados nesse trabalho indicam que, mediado pela presença de leucotrienos, macrófagos peritoneais de animais diabéticos sofrem reprogramação metabólica intensificando a via de oxidação de ácidos graxos e levando a ativação da proteína desacopladora UCP1. Este estado metabólico está intimamente ligado a função dessa célula na produção de citocinas importantes no contexto de inflamação crônica do DT1. Sugere-se que parte do fenômeno descrito se dá devido a perda acentuada de tecido adiposo e a inflamação nesse tecido que é mediada pela presença de leucotrienos.

5. DISCUSSÃO

A contribuição dos leucotrienos no estabelecimento da inflamação crônica de baixo grau do modelo de hiperglicemia DT1 já foi bastante discutido em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa (FILGUEIRAS et al., 2015a; RAMALHO et al., 2018; SEREZANI et al., 2011; WANG et al., 2014). Entretanto, as vias metabólicas celulares que suportam o estabelecimento dessa inflamação crônica ainda não tinham sido abordadas. Neste estudo, caracterizamos o estado metabólico do macrófago de camundongos diabéticos e avaliamos como isto interage com a função dessa célula e com as alterações sistêmicas do DT1.

Na caracterização das células presentes no peritônio, observamos uma frequência reduzida de células mieloides (CD45⁺CD11b⁺) em animais WT diabéticos que produzem leucotrienos. Podemos especular que células não mieloides possam migrar para a cavidade peritoneal em resposta a quimiotaxia promovida por LTB₄, detectado em altos níveis sistemicamente em camundongos diabéticos, conforme descrito anteriormente por nosso grupo (FILGUEIRAS et al., 2015a; TAGER et al., 2003)

Ao dosarmos citocinas no lavado peritoneal, detectamos apenas IL-12. Como IL-12 é uma citocina produzida principalmente por macrófagos inflamatórios (ATHIE-MORALES et al., 2004; POWELL et al., 2019), sugerimos que dentre as populações do peritônio de camundongos diabéticos, os macrófagos possam ser relevantes para o estabelecimento da inflamação sistêmica LTB₄-dependente no diabetes.

Além de células não mieloides, observamos que monócitos também migraram para a cavidade peritoneal de forma dependente da produção de leucotrienos. Como monócitos podem se diferenciar em macrófagos em processos inflamatórios (GINHOUX; JUNG, 2014; KIMBALL et al., 2018), também sugerimos que macrófagos peritoneais derivados de monócitos também possam contribuir para a produção de IL-12 na cavidade peritoneal.

Ao incubarmos os macrófagos de diabéticos *in vitro*, observamos que, além de IL-12, estas células também produzem IL-1 β de forma dependente de leucotrienos. Este achado corrobora os dados recentes que demonstraram ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente produção de IL-1 β em macrófagos de

camundongos e humanos com diabetes (DAVANSO et al., 2021). Em outro estudo recente, foi observado que o inflamassoma AIM2 exerce uma função protetora na condição de diabetes via produção de IL-18 (LEITE et al., 2020). Ainda não sabemos se os leucotrienos estão envolvidos com a ativação de inflamassomas em macrófagos de camundongos diabéticos, mas a produção de IL-1 β leucotrieno-dependente sugere um forte indício da ativação de Caspase-1 nos macrófagos dos diabéticos.

Sabe-se que UCPs podem ter sua atividade aumentada em resposta a ativação de NLRP3 para balancear o gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna e reduzir os níveis de ROS mitocondriais (PRÓCHNICKI; LATZ, 2017). Assim sendo, nossos dados indicam que o aumento da atividade de UCP1 leucotrieno-dependente nos macrófagos de diabéticos possa acontecer em resposta a vias de ativação de Caspase-1, que culminam na secreção de IL-1 β . Dano mitocondrial e clivagem proteolítica de enzimas glicolíticas são eventos que podem desencadear ativação de caspase-1 (PRÓCHNICKI; LATZ, 2017). De fato, o parâmetro de capacidade de reserva e os altos níveis de EROs mitocondrial sugerem uma atividade mitocondrial pouco eficiente a adaptação energética em condições de estresse nos macrófagos de camundongos diabéticos.

Estudos *in vitro* caracterizam macrófagos inflamatórios (M(LPS) ou também chamados M1) como majoritariamente glicolíticos com diminuída atividade mitocondrial (BAARDMAN et al., 2018; O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). Porém, não se pode ignorar que os efeitos sistêmicos e do microambiente que ocorrem *in vivo*, principalmente em doenças metabólicas, podem afetar a programação metabólica de macrófagos e influenciar na função dessas células (VAN DEN BOSSCHE et al., 2016).

Os macrófagos de animais diabéticos estão constantemente cercados pelo desbalanço glicêmico, insulínico e lipídico (CLELAND et al., 2013; PIERO, 2015; ROSENFALCK et al., 2002; WILLECKE et al., 2015). *Heatmap* para sensibilidade aos níveis de nutrientes mostrou que os macrófagos de animais diabéticos sentem essas alterações metabólicas sistêmicas e respondem aumentando a expressão gênica nas mais diversas vias fisiológicas e metabólicas.

Analisando em detalhes o metabolismo dos macrófagos de animais diabéticos, observamos que essas células não apresentam indícios fortes de atividade da via

glicolítica. O transportador de Glicose-6-fosfato(*Sc137a4*), Hexokinase-2 (*Hk2*) e Ketohexokinase (*Khk*)(CHOU; SIK JUN; MANSFIELD, 2013; DIGGLE et al., 2009; TAN; MIYAMOTO, 2015), por exemplo, tiveram expressão gênica reduzida em macrófagos de animais diabéticos. O mesmo foi observado para via de biossíntese de ácidos graxos, já que Acetyl-CoA carboxilase 1(*Acaca*), ácido graxo sintase (*Fasn*) e Estearoil-CoA dessaturase1(*Scd1*)(MASHIMA; SEIMIYA; TSURUO, 2009; PATON; NTAMBI, 2009; SVENSSON et al., 2016) foram reguladas negativamente em macrófagos de animais diabéticos.

As vias metabólicas mais expressas no *RNAseq* em macrófagos de animais diabéticos foram aquelas ligadas ao metabolismo oxidativo, evidenciado pela elevada respiração basal nessas células. Observamos que grande parte da demanda energética dessa célula, na condição de diabetes e sob efeito de leucotrienos, se dá principalmente pelo vazamento de prótons na CTE e menos pela produção de ATP. Devido a isto, macrófagos de animais diabéticos respondem melhor a uma demanda energética que exija trabalho máximo da CTE, mas não são capazes de produzir ATP extra em caso de demanda repentina, como observado nos parâmetros de respiração máxima e capacidade de reserva, respectivamente.

O vazamento de prótons acontece em consequência do desacoplamento mitocondrial promovido por UCPs. Embora a UCP1 seja comumente associada a termogênese no tecido adiposo marrom e bege, ela tem um papel primordial na proteção contra o estresse oxidativo (STIER et al., 2014; ZHAO et al., 2019). Especula-se que o papel antioxidante da UCP1 é uma característica ancestral dos mamíferos e, presumivelmente, a produção de calor veio depois como uma característica adaptativa (OELKRUG et al., 2014).

O desacoplamento promovido por UCP1 pode ser desencadeado pelo metabolismo de ácidos graxos na mitocôndria(NICHOLLS, 2006). A inserção elevada de elétrons da CTE devido a oxidação de ácidos graxos aumenta o potencial de membrana e induz a produção de EROs(SCIALÒ et al., 2016), corroborando nossos dados, já que macrófagos de animais diabéticos têm elevada produção de EROs mitocondriais. Além disso, o aumento da expressão proteica de UCP1 na presença do sobrenadante da lipólise, de maneira dependente de LTB₄, também corrobora essa afirmação. Portanto, nossos dados indicam fortemente que o desacoplamento na CTE dos macrófagos está acontecendo em resposta a um excesso da atividade

mitocondrial oriunda da FAO.

Outra evidência do eixo FAO/EROs/UCP1 LTB4-dependente é a acentuada queda na expressão gênica de *Ucp1* em macrófagos de animais diabéticos frente ao tratamento com Etomoxir. Além disso, o bloqueio do metabolismo de ácidos graxos, assim como a diminuição do desacoplamento, causou efeitos na função dos macrófagos, reduzindo drasticamente a produção de citocinas por essas células principalmente em animais selvagens diabéticos.

Diante deste resultado, sugerimos que, em macrófagos de animais diabéticos, a produção de EROs oriunda da FAO causa danos a mitocôndria e por isso induz a ativação de vias responsáveis pela produção de citocinas. A síntese de EROs assim como a disfunção mitocondrial promovem a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos, que resulta em produção de citocinas pró-inflamatórias (BULUA et al., 2011; RENDRA et al., 2019; ZHOU et al., 2011) sendo que o bloqueio de FAO por Etomoxir é capaz de suprimir essa ativação (MOON et al., 2016).

A relação entre EROs e a produção de citocinas inflamatórias explica indiretamente a produção de IL-10 em macrófagos de animais diabéticos. Sob o ponto de vista do estresse oxidativo é possível especular que IL-10 estimule a homeostase e a mitofagia de mitocôndrias danificadas, como já descrito por IP e colaboradores, 2017. A queda na produção de IL-10 diante do tratamento com Etomoxir condiz, portanto, com a diminuição do estresse oxidativo em macrófagos.

É importante ressaltar que, sobretudo, IL-10 é uma citocina regulatória e por isso é necessária para compensar efeitos adversos do perfil inflamatório em macrófagos. IL-10 inibi a transcrição de *Nos2* e estimula a degradação de INOS(CUNHA; MONCADA; LIEW, 1992; HUANG et al., 2002, 2009), também estimula a produção de Arginase, que limita a arginina disponível e reduz a produção de NO(CORRALIZA et al., 1994; SCHREIBER et al., 2009). O tratamento com Etomoxir reduziu a produção IL-10 e ao mesmo tempo induziu um aumento exagerado na transcrição de *Nos2* e diminuição da expressão de *Arg1*, indicando a importância dessa citocina na regulação do perfil pró-inflamatório.

Ainda é possível especular que mesmo em perfil pró-inflamatório, os macrófagos de animais diabéticos encontram-se metabolicamente exaustos e incapazes de responder a infecções, em parte devido à alta atividade oxidativa e ao

dano mitocondrial. MICHELET e colaboradores, 2018 demonstraram que o ambiente lipotóxico da obesidade torna células NK funcionalmente deficientes devido ao FAO, isso explicaria a susceptibilidade de diabéticos a infecções e sobretudo a sepse (FILGUEIRAS et al., 2015). Outros trabalhos também já demonstraram que macrófagos residentes de um microambiente hiper lipídico apresentam um fenótipo distinto em que marcadores pro- e anti-inflamatórios são expressos em elevados níveis simultaneamente (YANG; BOSSCHE; RAMALHO, 2020).

Macrófagos também estão sujeitos a um ambiente lipotóxico no diabetes. Nosso grupo demonstrou que o LTB₄ está associado a hiperlipidemia em camundongos diabéticos e sugeriu que essa condição aconteça devido à perda de adiposidade nestes animais (RAMALHO et al., 2019). Diante disso, nos ocorreu que perda de adiposidade presente no diabetes poderia estar associada a inflamação sistêmica induzida pelos leucotrienos.

Nossos dados mostram que leucotrienos induziram a alta produção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo epididimal de animais diabéticos, além de contribuírem para a perda pronunciada desse tecido. A inflamação no tecido adiposo pode contribuir para o quadro catabólico pois já foi demonstrado em doenças como caquexia, que TNF- α exercem uma importante função na perda de adiposidade (HAN et al., 2018). Como observamos menos perda de adiposidade e menos citocinas no tecido adiposo de camundongos diabéticos 5LO^{-/-}, sugerimos que a inflamação local leucotrieno-dependente contribua para o quadro catabólico do tecido adiposo nos animais diabéticos.

Diversos grupos demonstraram que a inibição genética ou farmacológica da 5LO ou BLT1 promovem uma melhora no quadro de resistência à insulina em função da melhora no quadro inflamatório no tecido adiposo de camundongos obesos (LI et al., 2015; MOTHE-SATNEY et al., 2012; SPITE et al., 2011). Nosso grupo demonstrou que o tratamento de camundongos DT1 com um inibidor farmacológico do BLT1 também promove uma certa proteção da perda de adiposidade (RAMALHO et al., 2019).

A hiperlipidemia é uma característica comum no diabetes tipo 1 e é descrito que os lipídeos circulantes são oriundos principalmente da lipólise no tecido adiposo (WILLECKE et al., 2015). Altos níveis de hiperlipidemia em animais diabéticos

também estão relacionados com a presença de leucotrienos (RAMALHO et al., 2019). Nossos resultados *in vitro* corroboram essas afirmações já que o aumento de UCP1 em macrófagos tratados com sobrenadante de lipólise se deu de maneira dependente de LTB4. Diante disso, podemos sugerir que o processo de lipólise associado a inflamação (também chamado de *meta-inflammation*) possa liberar LTB4. Esse mediador estimula a atividade oxidativa em macrófagos que mitiga os danos oriundos a FAO através da ativação de UCP1.

6. CONCLUSÃO

No diabetes tipo 1, macrófagos peritoneais aumentam a produção de citocinas como IL-12, IL-10 e IL-1 β devido ao metabolismo oxidativo mitocondrial. Essa reprogramação metabólica se dá em direção a oxidação de ácidos graxos, com a ativação da proteína desacopladora UCP1, sendo esse processo influenciado por leucotrienos. O substrato para o metabolismo de ácidos graxos em macrófagos provavelmente são lipídeos derivados da perda do tecido adiposo epididimal, tecido que também produz grande quantidade de citocinas pro-inflamatórias de maneira dependente de leucotrienos na condição de diabetes. Juntos, esses resultados mostram que leucotrienos são importantes mediadores do estabelecimento de *meta-inflammation* no contexto de diabetes.

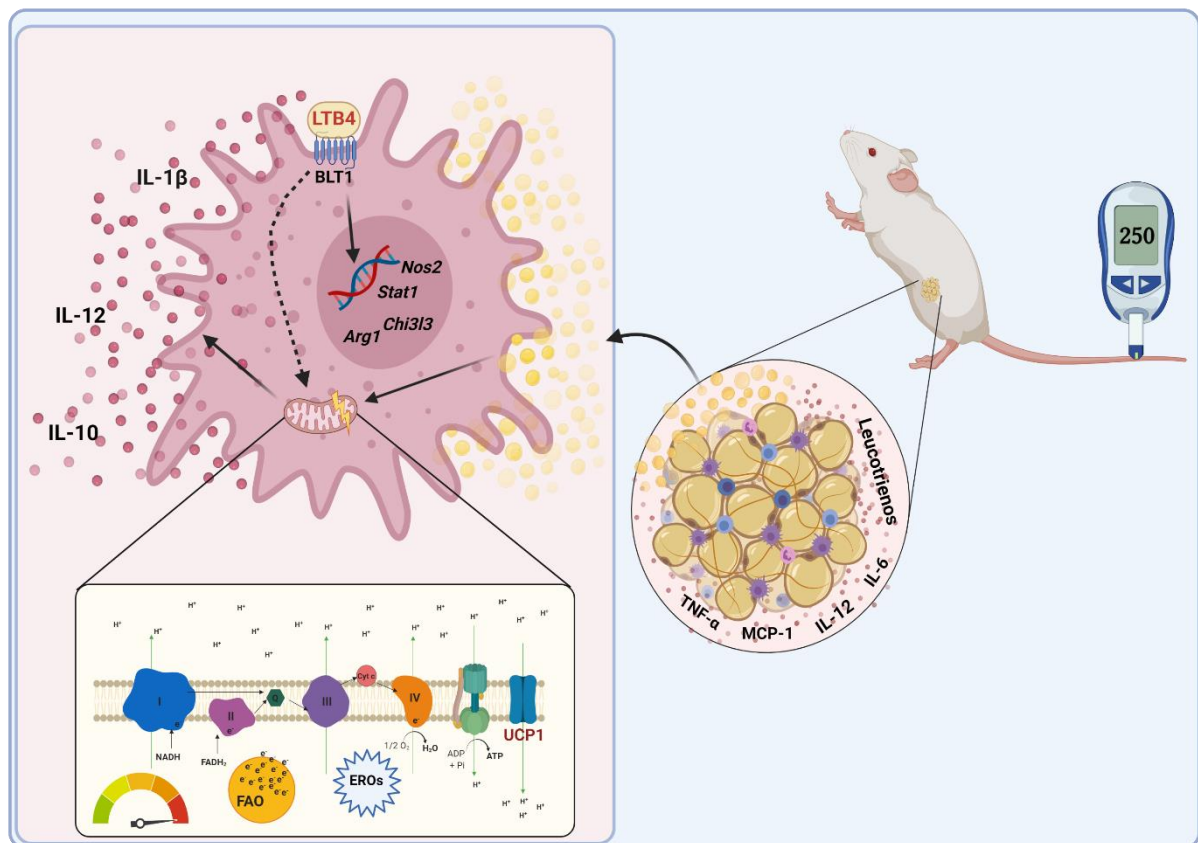


Figura 19. Esquematisação dos principais achados descritos nesse trabalho. Leucotrienos contribuem para metabolismo oxidativo de ácidos graxos de maneira dependente da proteína desacopladora Ucp1 em macrófagos peritoneais. A atividade mitocondrial elevada influencia diretamente na produção de citocinas como IL-1 β , IL-10, IL-12. Leucotrienos também induzem inflamação no tecido adiposo epididimal de animais diabéticos e perda de adiposidade. Esses resultados mostram que leucotrienos são importantes mediadores do estabelecimento de *meta-inflammation* no contexto de diabetes. Criado em BioRender.com.

REFERÊNCIAS

- ATHIE-MORALES, V. et al. Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 61–69, 2004.
- BAARDMAN, J. et al. A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. **Cell Reports**, v. 25, n. 8, p. 2044–2052.e5, 2018.
- BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293–1300, 2010.
- BULUA, A. C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 519–533, 2011.
- CAPUTO, T.; GILARDI, F.; DESVERGNE, B. From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions. **FERBS Letters**, v. 591, n. 19, p. 3061–3088, 2017.
- CATALOGUING, W. L. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 6–86, 2016.
- CHAIT, A. et al. Low-Density Lipoprotein Receptor Activity in Cultured Human Skin Fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, n. November, p. 1309–1319, 1979.
- CHHIBBER, V. L.; SORIANO, C.; TAYEK, J. A. Effects of low-dose and high-dose glucagon on glucose production and gluconeogenesis in humans. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 1, p. 39–46, 2000.
- CHOU, J. Y.; SIK JUN, H.; MANSFIELD, B. C. The SLC37 family of phosphate-linked sugar phosphate antiporters. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 601–611, 2013.
- CLELAND, S. J. et al. Insulin resistance in type 1 diabetes: What is “double diabetes” and what are the risks? **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1462–1470, 2013.
- CODO, A. C. et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 437–446.e5, set. 2020.
- CORDES, T. et al. Immunoresponsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 27, p. 14274–14284, 2016.
- CORRALIZA, I. M. et al. Arginase Induction By Suppressors of Nitric Oxide Synthesis IL4, IL10, PGE2 in Murine Bone marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. n.2, p. 667–673, 1994.
- COVARRUBIAS, A. J. et al. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. **eLife**, v. 5, n. FEBRUARY2016, p. 1–19, 2016.
- CUNHA, F. Q.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 182, n. 3, p. 1155–1159, fev. 1992.
- DAVANSO, M. R. et al. Macrophage inflammatory state in Type 1 diabetes: triggered by NLRP3/iNOS pathway and attenuated by docosahexaenoic acid. **Clinical Science**, v. 135, n. 1, p. 19–34, 5 jan. 2021.
- DIGGLE, C. P. et al. Ketohexokinase: Expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 763–774, 2009.

- DISKIN, C.; PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M. Metabolic modulation in macrophage effector function. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–17, 2018.
- DIVAKARUNI, A. S. et al. Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 490- 503.e7, 2018.
- DULLAART, R. P. F. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 46, n. 1, p. 44–54, 1995.
- ECHTAY, K. S. et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, n. January, p. 96–99, 2002.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014.
- ERTUNC, M. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: Indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 12, p. 2099–2114, 2016.
- FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.
- FILGUEIRAS, L. R. et al. Leukotriene B₄-mediated sterile inflammation favors susceptibility to sepsis in murine type 1 diabetes HHS Public Access. **Sci Signal**, v. 8, n. 361, p. 1–10, 2015a.
- FILGUEIRAS, L. R. et al. Leukotriene B₄-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of Type 1 diabetes. **Science Signaling**, v. 8, n. 361, p. 1–10, 2015b.
- FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: Setting the threshold for therapy. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2498–2502, 2011.
- FOLCO, G.; MURPHY, R. C. Eicosanoid transcellular biosynthesis: From cell-cell interactions to in vivo tissue responses. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 375–388, 2006.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current protocols in pharmacology**, v. 70, n. September, p. 5.47.1-5.47.20, 2015.
- GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. **Cmaj**, v. 175, n. 2, p. 165–170, 2006.
- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.
- GUIMARÃES, J. P. T. et al. Leukotriene Involvement in the Insulin Receptor Pathway and Macrophage Profiles in Muscles from Type 1 Diabetic Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 4596127, 2019.
- HAN, J. et al. Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2018.
- HARWOOD, J. L. Fatty Acid Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 101–38, 1988.
- HASCHEMI, A. et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 813–826, 2012.
- HOSOKAWA, M.; DOLCI, W.; THORENS, B. Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 5, p. 1114–1117, 2001.

- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.
- HUANG, C. J. et al. Interleukin-10 inhibition of nitric oxide biosynthesis involves suppression of CAT-2 transcription. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 79–84, 2002.
- HUANG, S. C. C. et al. Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 817–830, 2016.
- HUANG, W.-C. et al. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e275-86, set. 2009.
- IP, W. K. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.
- JENSEN, M. D.; EKBERG, K.; LANDAU, B. R. Lipid metabolism during fasting. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 4 44-4, p. 789–793, 2001.
- JHA, A. K. et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419–430, 2015.
- KANAOKA, Y.; BOYCE, J. A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Cellular Distribution and Function in Immune and Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 1503–1510, 2004.
- KIMBALL, A. et al. Ly6CHiblood monocyte/macrophage drive chronic inflammation and impair wound healing in diabetes mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 5, p. 1102–1114, 2018.
- KURYŁOWICZ, A.; KÓZNIIEWSKI, K. Anti-inflammatory strategies targeting metaflammation in type 2 diabetes. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020.
- LEITE, J. A. et al. The DNA Sensor AIM2 Protects against Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes by Regulating Intestinal Homeostasis via the IL-18 Pathway. **Cells**, v. 9, n. 4, abr. 2020.
- LEWIS, G. F. et al. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL ApoB production in normal weight and obese individuals. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 833–842, 1993.
- LI, P. et al. LTB₄ promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, p. 239–247, 2015.
- LIU, L. et al. Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- MAAHS, D. M. et al. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 481–497, 2010.
- MASHIMA, T.; SEIMIYA, H.; TSURUO, T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 9, p. 1369–1372, 2009.
- MATHIS, D.; SHOELSON, S. E. Immunometabolism: An emerging frontier. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 81–83, 2011.
- MICHAEL, M. D. et al. Adipose Tissue Selective Insulin Receptor Knockout Protects against Obesity and Obesity-Related Glucose Intolerance. **Developmental Cell**, v. 3, p. 25–38, 2002.
- MICHELET, X. et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1330–1340, 2018.

- MICHELUCCI, A. et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 19, p. 7820–7825, 2013.
- MICHL, B. Y. J.; OHLBAUM, D. J.; SILVERSTEIN, S. C. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. **The Journal of Experimental medicine**, v. 144, p. 1484–1493, 1976.
- MILLS, E. L. et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 457–470.e13, 2016.
- MOON, J. S. et al. NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. **Nature Medicine**, v. 22, n. 9, p. 1002–1012, 2016.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MOTHE-SATNEY, I. et al. Adipocytes secrete leukotrienes: Contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2311–2319, 2012.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4⁺ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 5347–5354, 1998.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. October, p. 541–566, 2017.
- NAGY, C.; HASCHEMI, A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. APR, p. 1–8, 2015.
- NAHDI, A. M. T. A.; JOHN, A.; RAZA, H. Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- NAMGALADZE, D.; BRÜNE, B. Macrophage fatty acid oxidation and its roles in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 11, p. 1796–1807, 2016.
- NEVES, J. A. J. et al. Increased leukotriene B4 plasma concentration in type 2 diabetes individuals with cardiovascular autonomic neuropathy. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 12, n. 1, p. 99, nov. 2020.
- NICHOLLS, D. G. The physiological regulation of uncoupling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 5–6, p. 459–466, 2006.
- NORDESTGAARD, B. G. et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: Current status. **European Heart Journal**, v. 31, n. 23, p. 2844–2853, 2010.
- O'NEILL, L. A. J. A Broken Krebs Cycle in Macrophages. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 393–394, 2015.
- O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–565, 2016.

- OELKRUG, R. et al. Antioxidant properties of UCP1 are evolutionarily conserved in mammals and buffer mitochondrial reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 210–216, 2014.
- PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. 28–37, 2009.
- PAVLOU, S. et al. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 14, n. 1, p. 12–17, 2017.
- PEARCE, E. J.; PEARCE, E. L. Driving immunity: All roads lead to metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 81–82, 2018.
- PERES, C. M. et al. Specific Leukotriene Receptors Couple to Distinct G Proteins to Effect Stimulation of Alveolar Macrophage Host Defense Functions. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5454–5461, 2007.
- PETERS-GOLDEN, M. et al. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 589–594, 2005.
- PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G. 5-Lipoxygenase and FLAP. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 2–3, p. 99–109, 2003.
- PIERO, M. N. Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 40, p. 1–7, 26 jan. 2015.
- POWELL, M. D. et al. IL-12 signaling drives the differentiation and function of a TH1-derived TFH1-like cell population. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- PRÓCHNICKI, T.; LATZ, E. Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. **Cell metabolism**, v. 26, n. 1, p. 71–93, jul. 2017.
- RAMALHO, T. et al. Impaired wound healing in type 1 diabetes is dependent on 5-lipoxygenase products. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- RAMALHO, T. et al. Leukotriene-B4 modulates macrophage metabolism and fat loss in type 1 diabetic mice. **Journal of Leukocyte Biology**, n. June, p. 1–11, 2019.
- REMMERIE, A.; SCOTT, C. L. Macrophages and lipid metabolism. **Cellular Immunology**, v. 330, n. October 2017, p. 27–42, 2018.
- RENDRA, E. et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. **Immunobiology**, v. 224, n. 2, p. 242–253, 2019.
- ROSENFALCK, A. M. et al. Body composition in adults with Type 1 diabetes at onset and during the first year of insulin therapy. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 5, p. 417–423, 2002.
- SAEKI, K.; YOKOMIZO, T. Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors. **Seminars in Immunology**, v. 33, n. July, p. 30–36, 2017.
- SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **The Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2267–2277, 2010.
- SANTOS-BEZERRA, D. P. et al. Leukotriene Pathway Activation Associates with Poor Glycemic Control and with Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Type 1 Diabetes. **Mediators of inflammation**, v. 2020, p. 5704713, 2020.
- SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 3, p. 231–241, 2008.
- SCHREIBER, T. et al. Autocrine IL-10 Induces Hallmarks of Alternative Activation in Macrophages and Suppresses Antituberculosis Effector Mechanisms without Compromising T Cell Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1301–1312, 2009.

- SCHWEIGER, M. et al. Measurement of Lipolysis. **Methods Enzymol**, n. 538, p. 171–193, 2014.
- SCIALÒ, F. et al. Mitochondrial ROS Produced via Reverse Electron Transport Extend Animal Lifespan. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 725–734, 2016.
- SEREZANI, C. H. et al. Leukotriene B4 amplifies NF- κ B activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 671–682, 2011.
- SPITE, M. et al. Deficiency of the Leukotriene B 4 Receptor, BLT-1, Protects against Systemic Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity . **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 1942–1949, 2011.
- SRIVASTAVA, L. M.; BORA, P. S.; BHATT, S. D. Diabetogenic action of streptozotocin. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 3, n. C, p. 376–378, 1982.
- STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318–328, 2006.
- STIER, A. et al. Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: A case study using UCP1 knockout mice. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 4, p. 624–630, 2014.
- SVENSSON, R. U. et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. **Nature Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1108–1119, 2016.
- TABAS, I.; BORNFELDT, K. E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 653–667, 2016.
- TAGER, A. M. et al. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 982–990, 2003.
- TAGER, A. M.; LUSTER, A. D. BLT1 and BLT2: The leukotriene B4 receptors. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 2–3, p. 123–134, 2003.
- TAN, V. P.; MIYAMOTO, S. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. **Autophagy**, v. 11, n. 6, p. 963–964, 2015.
- TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013.
- THOMAS, D. G. et al. LXR Suppresses Inflammatory Gene Expression and Neutrophil Migration through cis-Repression and Cholesterol Efflux. **Cell Reports**, v. 25, n. 13, p. 3774–3785.e4, 2018.
- VAN DEN BOSSCHE, J. et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. **Cell Reports**, v. 17, n. 3, p. 684–696, 2016.
- VAN DEN BOSSCHE, J.; BAARDMAN, J.; DE WINTHER, M. P. J. Metabolic characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived macrophages using real-time extracellular flux analysis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 105, p. 1–7, 2015.
- VAN DEN BOSSCHE, J.; O'NEILL, L. A.; MENON, D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? **Trends in Immunology**, v. 38, n. 6, p. 395–406, 2017.
- VATS, D. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13–24, 2006.
- VERGÈS, B. Lipid disorders in type 1 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 35, n. 5, p. 353–360, 2009.
- VIOLA, A. et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. July, p. 1–16, 2019.

- WANG, Z.; GLEICHMANN, H. GLUT2 in pancreatic islets: Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes**, v. 47, n. 1, p. 50–56, 1998.
- WILLECKE, F. et al. Lipolysis, and not hepatic lipogenesis, is the primary modulator of triglyceride levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 1, p. 102–110, 2015.
- WILLNOW, T. et al. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. **Science**, v. 264, p. 1471–1474, 1994.
- YAN, H. et al. Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 2, p. 424–429, 2003.
- YANG, S.; BOSSCHE, J. VAN DEN; RAMALHO, T. Macrophage Metabolism at the Crossroad of Metabolic Diseases and Cancer. **Immunometabolism**, v. 2, n. 3, p. e200022, 2020.
- ZHAO, R. Z. et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p. 3–15, 2019.
- ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221–226, 2011.

Artigos publicados durante o mestrado

Ramalho T., **Pereira N.**, Brandt S.L., Serezani C.H. (2020) Targeting Leukotrienes as a Therapeutic Strategy to Prevent Comorbidities Associated with Metabolic Stress. In: Kihara Y. (eds) *Druggable Lipid Signaling Pathways*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1274. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50621-6_4



Targeting Leukotrienes as a Therapeutic Strategy to Prevent Comorbidities Associated with Metabolic Stress

4

Theresa Ramalho, Nayara Pereira,
Stephanie L. Brandt, and C. Henrique Serezani

Abstract

Leukotrienes (LTs) are potent lipid mediators that exert a variety of functions, ranging from maintaining the tone of the homeostatic immune response to exerting potent proinflammatory effects. Therefore, LTs are essential elements in the development and maintenance of different chronic diseases, such as asthma, arthritis, and atherosclerosis. Due to the pleiotropic effects of LTs in the pathogenesis of inflammatory diseases, studies are needed to discover potent and specific LT synthesis inhibitors and LT receptor antagonists. Even though most clinical trials using LT inhibitors or antagonists have failed due to low efficacy and/or toxicity, new drug development strategies are driving the discovery for LT inhibitors to prevent inflammatory diseases. A newly important detrimental

role for LTs in comorbidities associated with metabolic stress has emerged in the last few years and managing LT production and/or actions could represent an exciting new strategy to prevent or treat inflammatory diseases associated with metabolic disorders. This review is intended to shed light on the synthesis and actions of leukotrienes, the most common drugs used in clinical trials, and discuss the therapeutic potential of preventing LT function in obesity, diabetes, and hyperlipidemia.

Keywords

Leukotrienes · Inflammation · Immune regulation · Clinical trials · Metabolic disorders · Diabetes

T. Ramalho · N. Pereira
Department of Immunology, University of Sao Paulo,
Sao Paulo, Brazil

S. L. Brandt
Division of Infectious Diseases, Department of
Medicine, Vanderbilt University Medical Center,
Nashville, TN, USA

C. H. Serezani (✉)
Division of Infectious Diseases, Department of
Medicine, Vanderbilt University Medical Center,
Nashville, TN, USA

Department of Pathology, Microbiology, and
Immunology, Vanderbilt University Medical Center,
Nashville, TN, USA

Vanderbilt Institute for Inflammation, infection, and
immunity (VI4), Vanderbilt University Medical
Center, Nashville, TN, USA

Vanderbilt Center for Immunobiology (VCI),
Vanderbilt University Medical Center,
Nashville, TN, USA
e-mail: h.serezan@vanderbilt.edu

