

DISSERTAÇÃO

JEAN DE LIMA

PAPEL DA SIRTUÍNA 1 NO FENÓTIPO E FUNÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NO CONTEXTO DO TRANSPLANTE EM ANIMAIS OBESOS

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
2020

DISSERTAÇÃO

JEAN DE LIMA

PAPEL DA SIRTUÍNA 1 NO FENÓTIPO E FUNÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NO CONTEXTO DO TRANSPLANTE EM ANIMAIS OBESOS

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. Dr. Niels Olsen Saraiva
Câmara.

Coorientador: Prof Dr. Vinicius de Andrade
Oliveira.

Versão original.

São Paulo
2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

De Lima, Jean
Papel da Sirtuína 1 no Fenótipo e Função de Células
Dendríticas no Contexto do Transplante de Animais
Obesos / Jean De Lima; orientador Niels Olsen
Saraiva Câmara; coorientador Vinicius de Andrade
Oliveira . -- São Paulo, 2020.
162 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade. 2. Células Dendríticas . 3. Sirtuína
1 . I. Olsen Saraiva Câmara, Niels , orientador. II.
de Andrade Oliveira , Vinicius , coorientador. III.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da sirtuína 1 no fenótipo e na função de células dendríticas no contexto do transplante de órgãos em animais obesos", protocolada sob o CEUA nº 8027280518, sob a responsabilidade de **Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Jean de Lima; Niels Olsen Saraiva Câmara; Paulo Josã© Basso; Fernanda Fernandes Terra; Meire Ioshie Hiyane** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 30/07/2018.

We certify that the proposal "The role of sirtuin 1 in the phenotype and function of dendritic cells in the context of transplantation in obese animals", utilizing 30 Genetically modified mice (GMO) (30 males), 40 Heterogenics mice (40 males), protocol number CEUA 8027280518, under the responsibility of **Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Jean de Lima; Niels Olsen Saraiva Câmara; Paulo Josã© Basso; Fernanda Fernandes Terra; Meire Ioshie Hiyane** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 07/30/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [24 meses](#)

Depto/Setor: [Imunologia](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongo geneticamente modificado \(OGM\)](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [C57BL/6 SIRT1fl/fl-CD11cCre](#)

N amostral: [30](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

N amostral: [30](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

N amostral: [10](#)

São Paulo, 30 de julho de 2018



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da sirtuína 1 no fenótipo e na função de células dendríticas no contexto dotransplante de órgãos em animais obesos", protocolada sob o CEUA nº 8027280518, sob a responsabilidade de **Niels Olsen Saraiva Câmara e equipe; Jean de Lima; Niels Olsen Saraiva Câmara; Paulo Josã© Basso; Fernanda Fernandes Terra; Meire Ioshie Hiyane** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 30/07/2018.

We certify that the proposal "The role of sirtuin 1 in the phenotype and function of dendritic cells in the context of transplantation in obese animals", utilizing 30 Genetically modified mice (GMO) (30 males), 40 Heterogenics mice (40 males), protocol number CEUA 8027280518, under the responsibility of **Niels Olsen Saraiva Câmara and team; Jean de Lima; Niels Olsen Saraiva Câmara; Paulo Josã© Basso; Fernanda Fernandes Terra; Meire Ioshie Hiyane** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 07/30/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [24 meses](#)

Depto/Setor: [Imunologia](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongo geneticamente modificado \(OGM\)](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [C57BL/6 SIRT1fl/fl-CD11cCre](#)

N amostral: [30](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

N amostral: [30](#)

Origem: [Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [8 a 10 semanas](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

N amostral: [10](#)

São Paulo, 06 de agosto de 2019



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, 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:

“The happiness is only real, when shared”

CHRISTOPHER MCCANDLESS

ENTIDADES DE FOMENTO

Este projeto recebeu suporte financeiro através da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: N° de processo 2018/04326-1 e 2019/07820-0). Além disso houve apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço imensamente ao meu orientador pelos ensinamentos, críticas e por sua amizade. O professor Niels nunca deixou de me incentivar e de acreditar no meu potencial. Ao mesmo tempo que ele demonstrou excelência na minha orientação e formação, ele sempre foi muito sensato, compreensivo e humano em suas decisões em relação a minha formação como pesquisador e pessoa, o que julgo raro na Pesquisa. Dificilmente cheguei cedo no laboratório somente por causa de experimentos ou por causa dos bolos maravilhosos feitos pelo meu orientador. Eu também chegava cedo para poder conversar com ele e assim apreender como lidar com a ciência e a vida, discutindo dados, artigos e música, paixão a qual ele manteve vivo dentro de mim durante muitas manhãs. Meu sincero obrigado ao melhor orientador que eu poderia ter e ao pesquisador que sempre usarei como exemplo para minha formação. *Niels, you are outstanding!*
- Meu muito obrigado ao meu coorientador Dr. Vinicius, mais conhecido como Zidane. Ele me ensinou o pensamento e métodos científicos duro necessário para que o reconhecimento chegue ao meu trabalho. Acredito sua persistência na minha formação, eu não poderia ter me sentido tão envolvido e contente em trabalhar com pesquisa. Obrigado Zidane, por seu apoio e amizade;
- Sou muito agradecido por meus pais e irmão, os quais sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Sempre levarei a gentileza da minha mãe e a honestidade do meu pai em meu caráter. Eles nunca deixaram que nada me faltasse durante a vida. Muitas vezes me deparei com eles tirando de onde não tinham para que eu pudesse seguir meus sonhos. Com todo meu amor, eu sempre direi que tenho imenso orgulho dos meus pais e irmão, os quais foram fundamentais para que eu chegasse no que almejo, como esse título de mestrado;
- Sou muito grato pelos meus queridos “*labmates*” (incluindo nossa querida técnica Meire e aos amigos de Lausanne). Muitos me ajudaram em experimentos e discussões relevantes do meu projeto. Acima disso, agradeço pela amizade que construímos, o que tornou o exaustivo ambiente de trabalho em algo que eu sentisse falta após cada expediente do mesmo;
- Gostaria de agradecer também meus colegas e amigos de outros laboratórios, os quais forma sempre solícitos e gentis. Porém, um agradecimento especial à Luísa, que de forma mútua dividiu inúmeras vezes a bancada, dores e conquistas comigo, jamais esquecerei de sua amizade e da sua qualidade como pesquisadora, a qual também tomo como exemplo de excelência;
- Obrigado a todos os meus amigos e parentes. Porém, gostaria de desejar um agradecimento especial para: Diogo, Ravel, Mariana, Felipe, Matheus, Ana, Carla, Dedé, Igor e ao meu primo Franklin. Essas pessoas me apoiaram emocionalmente de forma incrível em diversas situações, as quais poderiam ter sido terríveis sem eles ou não seriam tão felizes;

- Gostaria de agradecer também ao Professor Hans Acha-Orbea (Merci Hans!) que me recebeu em seu laboratório durante 6 meses na Suíça. Lá pude apreender como ser crítico sem ser antiético. Além disso, refinei minhas técnicas em Imunologia e aproveitei como nunca a vida;
- Obrigado a FAPESP, por todo o suporte financeiro para nosso projeto e minha formação. Sem essa ajuda, nada seria possível;
- Obrigado a Deus e tudo de divino que me protegeu e me guiou na minha trajetória até aqui;
- Obrigado aos camundongos do projeto, os quais foram essenciais;
- Obrigado Sheila e Dona Maria, vocês me ofereceram um lar incrível nos últimos meses do meu mestrado;
- Meu muito obrigado aos muitos colaboradores do ICB, de institutos e universidades que estiverem envolvidos no meu trabalho (inclusive pessoal da limpeza, portaria, secretaria, etc.), pois sempre foram muito prestativos e amigáveis, deixando minhas manhãs e madrugadas de experimento mais leve;
- Por fim, obrigado aos membros que constituíram a banca, os quais foram essências para meu trabalho.

RESUMO

A Sirtuína 1 (SIRT1) pertence a classe 3 de histona desacetilase (HDAC3), a qual atua na diferenciação e ativação de células dendríticas (DCs). Portanto, ao modular fatores de transcrição, proteínas citoplasmáticas e componentes do metabolismo, SIRT1 pode controlar as funções das DCs e a polarização e ativação de linfócitos T. Nossa hipótese foi que a obesidade influenciaria a expressão de SIRT1 nas DCs, alterando seu fenótipo e função e, conseqüentemente, ativação das células T CD4+, o que exacerbaria a resposta inflamatória na obesidade. Observamos que as DCs derivadas da medula óssea, de órgãos linfoides secundários e do tecido adiposo visceral de animais obesos possuíam menor expressão de SIRT1. Além de BMDCs de animais obesos possuírem atividade de SIRT1 reduzida, quando comparado às BMDCs de animais magros. A ausência da expressão de SIRT1 nas DCs de animais obesos promoveu um impacto no metabolismo mitocondrial, sendo que a inibição de SIRT1 reduziu OXPHOS e aumentou o ECAR, contrastando com o tratamento com Resveratrol que promoveu um efeito oposto. A redução na SIRT1 aumentou a expressão de MHC-II, CD86 e CD40, aumentou a produção de IL-12p40 e diminuiu a produção de TGF- β , culminando com maior polarização de células T CD4+ para o subtipo Th1. O aumento na SIRT1 em DCs induziu uma polarização de linfócitos T para um perfil regulador (CD25+Foxp3+). Corroborando esses dados, animais seletivamente desprovidos de SIRT1 em DCs (SIRT1^Δ), submetidos ao modelo de obesidade induzida por dieta, tiveram maior resistência à insulina e menor tolerância à glicose. Estas alterações estavam correlacionadas com o aumento da quantidade de gordura visceral (VAT) dos animais SIRT1^Δ e menor frequência de DCs do subtipo cDC1 e maior de cDC2. Ademais, a via de quinurenina estava reduzida em animais obesos, principalmente na ausência de SIRT1. Por fim, identificamos que SIRT1 regula positivamente a expressão de *Ido1*. Portanto, o presente trabalho identificou que SIRT1 controla o metabolismo e as funções de DC, via modulação da via da quinurenina e IDO1, fenótipos mais impactados na obesidade. O eixo SIRT1-IDO1 pode ser um novo alvo no tratamento da inflamação crônica presente na obesidade e de comorbidades associadas.

Palavras chave: Sirtuína 1. Indoleamina 2,3 dioxigenase. Célula dendríticas. Obesidade.

ABSTRACT

Sirtuin 1 (SIRT1) belongs to class 3 histone deacetylase (HDAC3) with a role in differentiating and activating dendritic cells (DCs). Therefore, by modulating transcription factors, cytoplasmic proteins and metabolism components, SIRT1 can control the functions of DCs and the polarization and activation of T lymphocytes. Our hypothesis was that obesity would influence the expression of SIRT1 in DCs, changing its phenotype and function and, consequently, activation of CD4 + T cells, which would exacerbate the inflammatory response in obesity. We observed that DCs derived from bone marrow, secondary lymphoid organs and visceral adipose tissue from obese animals had less expression and, in BMDCs from obese animals, SIRT1 activity was reduced when compared to BMDCs from lean animals. The absence of SIRT1 expression in the DCs of obese animals had an impact on mitochondrial metabolism, and the inhibition of SIRT1 reduced OXPHOS and increased ECAR, in contrast to the treatment with Resveratrol which promoted an opposite effect. The reduction in SIRT1 increased the expression of MHC-II, CD86 and CD40, increased the production of IL-12p40 and decreased the production of TGF- β , culminating in greater polarization of CD4 + T cells to the Th1 subtype. The increase in SIRT1 in DCs induced a polarization of T lymphocytes to a regulatory profile (CD25 + Foxp3 +). Corroborating these data, animals selectively devoid of SIRT1 in DCs (SIRT1^A), submitted to the diet-induced obesity model, had greater insulin resistance and less glucose tolerance. These changes were correlated with an increase in the amount of visceral fat (VAT) of the SIRT1^A animals and a lower frequency of DCs of the cDC1 subtype and greater of cDC2. In addition, the Kynurenine pathway was reduced in obese animals, especially in the absence of SIRT1. Finally, we identified that SIRT1 positively regulates the expression of Ido1. Therefore, the present study identified that SIRT1 controls the metabolism and functions of DCs, via modulation of the Kynurenine pathway and IDO1, phenotypes most impacted in obesity. The SIRT1-IDO1 axis may be a new target in the treatment of chronic inflammation present in obesity and associated comorbidities.

Keywords: Sirtuin 1. Indoleamine 2,3 dioxygenase. Dendritic cell. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Genótipo dos animais com deleção condicional de SIRT1 em DCs (Itgax/CD11c), indetificados como SIRT1^Δ.....55
- Figura 2** - SIRT1 em BMDCs/SD e HFD, tem expressão gênica, proteica e atividade diferentes.....70
- Figura 3** - Alterações em SIRT1 promovem modificações em componentes essenciais para apresentação antigênica de BMDCs/SD e HFD.....75
- Figura 4** - Alterações diferenciadas em BMDCs/SD e HFD modificaram a proliferação e polarização de células T CD4+ antígeno-específicas *in vitro*.....79
- Figura 5** - Animais em HFD sem SIRT1 em DCs, possuem um desbalanço nas proporções de subpopulações de DCs nos linfonodos e alterações em hallmarks essenciais para apresentação antigênica.....83
- Figura 6** - Animais em HFD sem SIRT1 em DCs, possuem um desbalanço na homeostase sistêmica da glicose, além de possuir diferentes porcentagens de subpopulações de cDCs, as quais estão mais ativadas do que cDCs em animais somente sem SIRT1 em DCs ou unicamente em HFD, pricipalemnte no VAT.....89
- Figura 7** - DCs sem SIRT1, principalmente dentro do contexto da obesidade, alteram a diferenciação e ativação de linfócitos TCD4+ em órgãos linfoides secundários de animais SIRT^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD ou HFD.....92
- Figura 8** - Tanto o processo de OXPHOS, quanto de Glicólise das BMDCs são afetadas pela administração de HFD *in vivo* e pela modulação de SIRT1 *in vitro*.....98
- Figura 9** - SIRT1 regula o funcionamento das vias catabólicas do triptofano em DCs, as quais estão em órgãos linfóides secundários e no VAT de camundongos, assim como no VAT de pacientes obesos..... 103
- Figura 10** - Ausência deIDO interfere na modulação do fenótipo de BMDCS/SD e HFD por SIRT1. 106
- Figura 11**- A deleção de SIRT1 em DCs e a obesidade não influenciaram diretamente na rejeição do enxerto de pele semi-alogênico 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados.....	48
---	----

ABREVIATURAS

Adam-17 - *Disintegrin And Metalloproteinase*

AhR - Receptor Aril-Hidrocarboneto

AMPK - Adenosina Monofosfato Quinase

AP-1 - *Activator Protein 1*

APC - *Antigen Presenting Cells*

ATM – *Adipose Tissue Macrophage*

BCL-2 - *B-cell lymphoma 2*

BMDCs - Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea

BMDCs/HFD - *Bone Marrow Derived Dendritic cells from High Diet Mice*

BMDCs/SD – *Bone Marrow Derived Dendritic cells from Standard Diet Mice*

BMI - *Body Mass Index*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

cAMP - monofosfato cíclico de adenosina

cDC2A – Célula Dendrítica Convencional 2 do Subtípo A

cDC2B - Célula Dendrítica Convencional 2 do Subtípo B

cDCs - DCs convencionais

CDP- progenitores comuns de células dendríticas

CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animal

CPT1 α - *carnitina palmitol transferase 1 alfa*

CXCR4 - *C-X-C chemokine receptor type 4*

DAG - Diacilglicerol

DCs – células dendríticas

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ECAR - *Extra Cellular Acidification Rate*

EX-527 - 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-Carbazol-1-carboxamida

FOXO - *Forkhead Family of Transcription Factors*

Foxp3 – *Forkhead Box P3*

GM-CSF - *Recombinant Murine GM-CSF*

GODT - *Global Observatory on Donation and Transplantation*

GTT – *Glucose tolerance Test*

HDACi - Inibidores De Histona Desacetilase

HDACs - Histona Desacetilases

HIF1- α - Indutor De Hipóxia 1 Subunidade Alpha

HLA - *Human Leukocyte Antigen*,

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase

IDO KO – *Knockout de Id α 1*

IDO1- Indoleamine 2,3 Dioxygenase Subunit 1

IFN- γ – interferon gamma

IKK β – I κ B quinase

IL – Interleucina

IL-12R β 2 – *IL-12 receptor beta subunit 2*

ILC- linfócitos inatos

IMDM - *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

IR - *Insulin Resistance*

IRF1 – Fator Regulador De Interferom 1

IRF4 - Fator Regulador de Interferon 4

iRNA – RNA de interferência

ITT – *Insulin Tolerance Test*

JNK1 - c-Jun N-terminal quinase

LR - *Lipids Rafts*

M1 - Macrófagos do subtipo 1

M2 - Macrófagos do subtipo 2

MAPKp38 - *p38 MAP Kinase*

MDP - progenitor de macrófagos

MHC - *Major Histocompatibility Complex*

MRM - *Multiple Reaction Monitoring*

MSCs - Células-Tronco Mesenquimais

mTOR - *Mammalian Target of Rapamycin*

NAD - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NAMN - Mononucleótido de Ácido Nicotínico

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NK – *Natural killer cell*

NMN - Mononucleótido de Nicotinamida

NRF - *Nuclear Respiratory Factor*

OCR – *Oxygen Consumption Rate*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - proteína reativa C

PGC-1 α - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*

PKC - Proteínas Quinases C

PPAR- γ - *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

pre-cDC – Progenitor de célula dendrítica convencional

QA - *Quinolinic Acid*

qPCR - *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

QPRT - *Quinolate Phosphoribosyltransferase*

RBT - Registro Brasileiro de Transplante

RES - Resveratrol

RMPI 1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

ROR γ T - *RAR-Related Orphan Receptor Gamma of T Cells*

RSV - vírus sincicial respiratório

RXR - receptor retinóico X

SAHA - Ácido Suberoilânida Hidroxâmico

SAT - *Subcutâneos Adipose Tissue*

SFB - Soro fetal Bovino

SIRT1 - Sirtuína 1

SIRT1 Δ - Deleção Condicional de *Sirt1* em Células Dendríticas

SIRT1^{fl/fl} - Animal *Sirt1* com as etiquetas *loxP* sem *Cre-recombinase* em CD11c

SIRTs - Sirtuínas

SPF - *Specific Pathogen Free*

STAT3 - *Signal Transducers and Activators of Transcription*

T2D - *Type 2 Diabetes mellitus*

T-bet - *T-Box Transcription Factor TBX21*

TBST - Tris-Buffered Saline and Tween 20

TDO - triptofano 2,3-dioxigenase

TGF- β - *Tumor Grown Factor beta*

TGF- β R2 - *TGF- β receptor subunit 2*

Th2 - Células T *helper*

TNF α - Fator de necrose tumoral alpha

Tr1 - *Type 1 Regulatory Cell*

Treg - Células T reguladora

TSA - Tricostatina A

USP - Universidade de São Paulo

USRDS - Sistema de Dados Renais dos Estados Unidos

VAT - *Visceral Adipose Tissue*

VDR - Receptor de Vitamina D

WAT - *White Adipose Tissue*

WOF - *World Obesity Federation*

WT - *Wild Type*

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 A OBESIDADE	23
1.2 OBESIDADE E A RESPOSTA IMUNE	24
1.3 TRANSPLANTE DE ORGÃOS	27
1.4 TRANSPLANTE DE ORGÃO SÓLIDOS E A RESPOSTA IMUNE	28
1.5 O IMPACTO DA OBESIDADE NO TRANSPLANTE	31
1.6 DCS NA OBESIDADE E NO TRANSPLANTE	32
1.7 MECANISMOS PARA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO E FUNÇÃO DE DCS	34
1.7.1 Sirtuínas (HDAC3).....	36
1.7.2 Sirtuína 1 na resposta imune e metabolismo	39
2. OBJETIVO GERAL.....	42
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MÉTODOS.....	44
3.1 ANIMAIS.....	44
3.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	44
3.3 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA	45
3.4 GERAÇÃO DE BMDCS DE CAMUNDONGOS.....	45
3.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DAS BMDCS COM RESVERATROL E EX-527	47
3.6 IMUNOFENOTIPAGEM E AGRUPAMENTO VIA TNSE	47
3.8 SÍNTESE DE cDNA (DNA complementar)	50
3.9 qPCR.....	51
3.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	52
3.11 ELISA	53
3.10 EXTRAÇÃO DE DNA PARA GENOTIPAGEM.....	53

3.12 GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS <i>CRE-LOX</i>	53
3.13 CO-CULTIVO ENTRE BMDCS PULSADAS COM OVA E CÉLULAS T CD4+ <i>NAIVE</i> DERIVADAS DE ANIMAIS OT-II.....	55
3.14 TRANSPLANTE DE PELE	56
3.15 CAPTAÇÃO DE GLICOSE.....	57
3.16 ENSAIO DE DOSAGEM DE LACTATO E GLICOSE.....	57
3.17 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (LC-MS)	58
3.18 <i>SEAHORSE XF96</i>	59
3.19 <i>WESTERN BLOT</i>	60
3.20 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SIRT1	61
3.21 DIGESTÃO DE TECIDOS: BAÇO, LINFONODOS e TECIDO ADIPOSEO	62
3.21.1 Processamento de baço e linfonodos.....	62
3.21.2 Processamento do tecido adiposo branco (WAT).....	63
3.22 MICROSCOPIA CONFOCAL	64
3.23 ANÁLISE DE BIOINFOMÁTICA DE BANCO DE DADOS.....	65
3.24 CALORIMETRIA.....	66
3.25 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
4. RESULTADOS	67
4.1 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ATIVIDADE DE SIRT1 EM BMDCS DE ANIMAIS MAGROS E OBESOS.....	67
4.2 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SIRT1 AFETA O FENÓTIPO DE BMDC/SD E HFD	70
4.3 IMPACTO DA MODULAÇÃO DE EXPRESSÃO SIRT1 NA FUNÇÃO DAS BMDC/SD E HFD NA ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS T.....	75
4.4 AUSÊNCIA DE SIRT1 ALTERAM AS SUBPOPULAÇÕES DE DCS EM ÓRGÃOS LINFOIDES SECUNDÁRIOS DE ANIMAIS SOB DIETA HIPERLIPÍDICA	79

4.5 ALTERAÇÃO NAS FUNÇÕES E NA DISTRIBUIÇÃO DE DCS DEFICIENTES DE SIRT1 NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO AFETA A HOMEOSTASE DA GLICOSE.....	83
4.6 AUSÊNCIA DE SIRT1 EM DCS AFETA ATIVAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE CÉLULAS T CD4+ <i>IN VIVO</i>	89
4.7 ALTERAÇÕES DO FENÓTIPO DE BMDCS/SD E HFD DEPENDENTES DE SIRT1 TEM INFLUÊNCIA DIRETA DO METABOLISMO CELULAR.....	93
4.8 A VIA DE QUINURENINA É REGULADA POR SIRT1 EM DCS.....	99
4.9 AUSÊNCIA DE IDO INTERFERE NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE BMDCS/SD E HFD POR SIRT1	104
4.10 DELEÇÃO DE SIRT1 EM DCS E A OBESIDADE NÃO TEM EFEITO ADITIVO NA REJEIÇÃO DE ENXERTO SÓLIDOS.....	107
5. DISCUSSÃO.....	108
6. CONCLUSÃO.....	129
7. REFERÊNCIAS	131
ANEXO.....	162

1. INTRODUÇÃO

1.1 A OBESIDADE

A obesidade é definida como o excesso de peso associado ao acúmulo de tecido adiposo branco (em inglês, *White Adipose Tissue*, WAT), que pode ser prejudicial à saúde. Inicialmente, um indivíduo era considerado obeso a partir da razão do seu peso corporal e estatura (HARRISON; PH, 2016). (ATKINSON; MOLITCH; DAHMS, 2018). No entanto, com o passar dos anos, essa razão simples ficou ultrapassada, pois não considerava a adiposidade dos indivíduos. Portanto, as sociedades médicas e a Organização Mundial da Saúde (OMS) optaram pelo uso do índice de massa corporal (do inglês, *body mass index*, BMI), que é uma medida do peso corporal ajustado para altura ao quadrado [peso (kg)/altura²] (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Segundo a OMS, indivíduos com sobrepeso são aqueles que têm um tecido adiposo aumentado com pouca probabilidade de gerar morbidades e que possuem BMI acima de 25 e abaixo de 29,9. Já os indivíduos obesos são classificados de 1 a 3, sendo que essa classificação é baseada na probabilidade crescente de um indivíduo desenvolver uma comorbidade (FRIEDMAN, 2003). A obesidade de classe 1 tem o BMI de 30-34,9. Os indivíduos obesos da classe 2 possuem BMI na faixa de 35-39,9 e, por fim, os obesos da classe 3 têm o BMI acima de 40 (WHO, 2019).

A obesidade é hoje um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Em 2016, um estudo da OMS revelou que mais de 35% dos adultos ao redor do globo estavam com sobrepeso. Além disso, mundialmente cerca de 20% das crianças e jovens entre 5-19 anos tem sobrepeso (WHO, 2016). A Federação Mundial para

Obesidade (do inglês, *World Obesity Federation*, WOF) demonstrou que, em 2019 cerca de 25% dos indivíduos com sobrepeso e, mais de 70% dos casos de obesidade, estão associados com outras comorbidades, como aterosclerose e diabetes mellitus do tipo 2 (T2D) (WORLD OBESITY FEDERATION, 2019).

O Brasil possui altos índices de sobrepeso e obesidade segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO, 2016) com aproximadamente 50% da população na faixa de sobrepeso e 20% na de obesidade. Em algumas regiões brasileiras, como Sul e Sudeste, mais de 35% das crianças entre 5-9 anos estavam com excesso de peso em 2016 (ABESO, 2016). A projeção mundial para 2025 é de que 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões sejam obesos (ABESO, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

1.2 OBESIDADE E A RESPOSTA IMUNE

A obesidade é caracterizada como um estado de inflamação basal associado a hiperplasia do tecido adiposo, o que por sua vez aumenta a possibilidade do surgimento de morbidades, como T2D (QUANTE et al., 2015). O aumento do número e do tamanho de adipócitos oferece uma comunicação entre diversas células imunes residentes e outras que migram para o tecido adiposo vinda dos vasos sanguíneos e linfáticos (AMANO et al., 2014; TILG; MOSCHEN, 2006). O tecido adiposo de um indivíduo magro é caracterizado por um perfil de células imunes como eosinófilo, células T *helper* 2 (Th2), macrófagos do subtipo 2 (M2), e células T reguladoras (Tregs), enquanto que o tecido adiposo de um indivíduo obeso possui características

celulares de imunidade tipo 1, isto é, composto por células CD8 citotóxicas, Th1, neutrófilos, macrófagos M1 e neutrófilos. Ainda não se sabe exatamente os mecanismos que regem essa polarização, mas acredita-se que o fenótipo e a quantidade das células imunes são alterados pelo microambiente formado com acúmulo de lipídeos, glicose e diversas citocinas (interleucinas (IL)-6, IL-1 β , o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), etc.)(LU et al., 2019). Esse perfil de células imunes altera a sensibilidade à insulina e promove a susceptibilidade a diversos tipos de doenças infecciosas (AYARI et al., 2020; LENZ et al., 2020), câncer (MICHELET et al., 2018; PARK et al., 2014) e impactos negativos em procedimentos cirúrgicos (ARMSTRONG et al., 2005; QUANTE et al., 2015).

O TNF- α está altamente expresso no tecido adiposo, e foi positivamente relacionado com o desenvolvimento de IR (do inglês *Insulin Resistance*, IR) em camundongos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Em humanos, a IL-6 e a proteína reativa C (PCR) são bons exemplos de fatores que contribuem significativamente para o desenvolvimento de T2D (HU et al., 2000). Tanto em modelo animal, quanto em humanos, foi visto que IL-6 e TNF- α são secretados principalmente por adipócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo (do inglês, *Adipocytes Tissue Macrophage*, ATM)(WEISBERG et al., 2003). Ainda, vias de sinalização canônicas pró-inflamatórias, tais como IKK β -JNK1 e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), estão funcionalmente mais ativas em diversas células do sistema imune inato residente no tecido adiposo de indivíduos obesos (GO; UYSAL; MAEDA, 2002; YUAN; KONSTANTOPOULOS; LEE, 2001).

Outras células do sistema imune inato, com células *natural killers* (NK), linfócitos inatos (ILCs)(SUBSETS et al., 2018; SULLIVAN et al., 2016; WANG et al., 2019) e, principalmente, células dendríticas (DCs), têm papel importante no desenvolvimento das desordens metabólicas associadas à obesidade (CHO et al., 2016a; MACDOUGALL et al., 2018). Por exemplo, DCs no WAT de animais e indivíduos obesos possuem um perfil principalmente pró-inflamatório, que por sua vez, favorece a polarização de linfócitos T CD4+ em células Th17, as quais estão relacionadas com IR (BERTOLA et al., 2012). Além disso, as DCs convencionais do tipo 1 e 2 (cDC1 e cDC2, respectivamente) possuem um papel fundamental em regular a homeostase do tecido adiposo. Enquanto as cDC1, através da ativação da via Wnt/ β -catenina, promovem a produção de IL-10, as cDC2, positivas para PPAR- γ , regulam o catabolismo de ácidos graxos nos adipócitos, mantendo assim, a homeostasia no WAT em um indivíduo saudável. Por outro lado, o desbalanço na proporção dessas cDCs durante a obesidade contribui com a inflamação do tecido adiposo e desenvolvimento de IR (SUBSETS et al., 2018).

Desta forma, se torna relevante o desenvolvimento de projetos que busquem compreender como essas células do sistema imune inato atua perante o contexto de obesidade, bem como entender como essa mudança de genótipo e fenótipo celular afeta as células do sistema imune adaptativo. (DENG et al., 2013; NEWTON; PRIYADHARSHINI; TURKA, 2016). O entendimento do diálogo entre as células inatas e as adaptativas pode ser especialmente importante para compreender os mecanismos associados as comorbidades desenvolvidas na obesidade, como T2D, (ANDRADE-OLIVEIRA; CÂMARA; MORAES-VIEIRA, 2015), aterosclerose

(SANDFORT et al., 2016) e rejeição de órgãos sólidos (BOUTAYEB A, 2017; PISCHON; SHARMA, 2001).

1.3 TRANSPLANTE DE ORGÃOS

Segundo o Observatório Global em Doações e Transplantes (em inglês: *Global Observatory on Donation and Transplantation, GODT*), o número de transplantes de órgãos sólidos realizados no ano de 2017 foi de 139 mil em todo o mundo, ou seja, aproximadamente um transplante foi realizado a cada 16 horas. Além disso, a projeção para os anos seguintes é de um aumento considerável, sendo que entre 2015 e 2017, já houve um aumento de 7,25% nos transplantes. Apesar do aumento no número de transplantes, a quantidade de doadores disponíveis não supre a demanda de indivíduos que necessitam de transplante, o que demonstra uma necessidade de esforços no sentido de conscientizar a população para a importância da doação de órgãos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES (ONT), 2019). Os transplantes renais lideram como tipo de transplante mais realizados em todo o mundo (36%), seguido de cardíacos (21.30%), e os de fígado (19%)(WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES (ONT), 2019).

No Brasil, segundo o Registro Brasileiro de Transplante (RBT), a média de transplantes de órgãos sólidos realizados entre os meses de Janeiro e Março em 2020 foi de 3409 (TRANSPLANTES, 2020). Mesmo que o número de doadores tenha aumentado nos últimos anos, o número de potenciais doadores que não se tornaram efetivamente doadores foi de 2730, somente entre de janeiro e março em 2020. Em

acrécimo, no Brasil, há uma grande lista de espera para realização de transplantes de órgãos sólidos de mais de 37 mil pessoas (TRANSPLANTES, 2020). Parte dessa grande lista deve-se ao fato de que os pacientes que já foram transplantados podem eventualmente perder o órgão transplantado e voltarem para a fila. De fato, as rejeições agudas e crônicas ainda são obstáculos quando se olha para a sobrevivência do enxerto de pacientes transplantados, mesmo com a melhora do tratamento do paciente transplantado e dos protocolos de regime de imunossupressão (HALLORAN, 2004; YANG et al., 2018).

Mesmo com o aumento no número de transplantes realizados, ainda é necessário explorar como a rejeição se desenvolve, novas medidas para amenizar as consequências a curto, médio e longo prazo após o transplante. Apesar de melhores drogas imunossupressoras terem surgido nos últimos anos (HALLORAN, 2004), os pacientes ainda são totalmente dependentes dessas drogas pelo resto de suas vidas e o custo do tratamento pós-operatório é, na sua grande maioria, exorbitante.

1.4 TRANSPLANTE DE ORGÃO SÓLIDOS E A RESPOSTA IMUNE

Inicialmente, médicos e pesquisadores não entendiam ao certo o porquê de alguns órgãos serem rejeitados mais rapidamente que outros. Depois de muitos casos de insucesso e procedimentos sem reprodutibilidade, George Snell e Peter Gorer, com experimentações em animais, concluíram que a rejeição de algum órgão envolvia fatores filogenéticos importantes (SNELL; JACKSON; HARBOUR, 1948). Posteriormente, Jean Dausset identificou alguns destes fatores, mais especificamente, os antígenos leucocitários humanos (do inglês, *Human Leukocyte*

Antigen, HLA)(DAUSSET, 1958). Sendo assim, Snell e Gorer cunharam o termo Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC). Neste estudo, eles descreveram os maiores *loci* genômicos, que ao serem transcritos e traduzidos, originam moléculas de superfície que determinam a compatibilidade entre tecidos a nível molecular, celular e tecidual (SNELL; JACKSON; HARBOUR, 1948).

Embora atualmente a combinação das moléculas de MHC, entre doador e receptor, seja considerado essencial para o sucesso de um transplante (TASAKI, 1990), somente depois de alguns anos de estudos moleculares e celulares foi comprovado que as moléculas de MHC têm um papel fundamental durante a sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígenos (do inglês, *antigen presenting cells*, APC), principalmente relacionado a DCs, e linfócitos T (SILVA et al., 2017).

Todavia, no caso do transplante, se destacam alguns tipos de apresentações antigênicas específicas. Na apresentação direta, células T aloreativas do receptor são diretamente ativadas pelo reconhecimento de aloantígenos acoplados a moléculas intactas de MHC de classe I ou classe II na superfície das APCs do doador. Por outro lado, a apresentação indireta, envolve a captura e o processamento de antígenos do doador e apresentação em moléculas de MHC de classe I e classe II pelas APCs do receptor para as células T do receptor. Mais recentemente, foi descrito a apresentação semi-indireta, a qual está relacionada com a interação entre células T e APCs que levam ao intercâmbio de complexos MHC: peptídeos pelo contato direto entre células (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010; SILVA et al., 2017). Por fim,

em qualquer tipo de apresentação antigênica, os mecanismos efetores que provocam a rejeição são comandados majoritariamente por subtipos de linfócitos T CD4+ (WOOD; GOTO, 2012). No entanto, esses mecanismos efetores são dependentes da eficiência na apresentação antigênica das DCs do doador e receptor para que o processo de rejeição aconteça.

Há três tipos de rejeição descritos: rejeição hiperaguda, aguda e crônica (ABUL K ABBAS; ANDREW H LICHTMAN; SHIV PILLAI, 2018). A rejeição hiperaguda é caracterizada pela preexistência de anticorpos contra antígenos do doador (IgG e IgM, geralmente previamente formados), que ativam o sistema complemento ou células do sistema imune inato causando lesões endoteliais, levando a oclusão trombótica vascular do enxerto, dentro de minutos ou horas, logo após anastomose entre os vasos do enxerto e do sistema circulatório do receptor (SILVA et al., 2017).

A rejeição aguda, entretanto, é decorrente de mecanismos efetores de linfócitos T CD4+ e T CD8+ que provocam lesão no parênquima e nos vasos sanguíneos do enxerto em semanas ou meses após o transplante. De maneira semelhante, a rejeição crônica está relacionada com a oclusão vascular causada pela proliferação de células do músculo liso da íntima e por depósitos de colágeno no parênquima que resulta do acúmulo de citocinas e de outros fatores liberados pelas células T e fagócitos reativos ao enxerto (SILVA et al., 2017; WOOD; GOTO, 2012).

À medida que as terapias imunossupressoras para rejeição hiperaguda e aguda melhoraram, a maior causa relacionada a falha na aceitação de aloenxertos passou a ser a rejeição crônica (WOOD; GOTO, 2012), sendo necessário realizar estudos que desvendem os processos que desencadeiam ou exacerbam essa

rejeição. Dentre as possibilidades poderíamos pensar nos processos inflamatórios que eventualmente exacerbariam uma resposta inflamatória crônica, como no caso da obesidade que tem inflamação crônica de baixo grau, que poderia auxiliar no processo de rejeição crônica.

1.5 O IMPACTO DA OBESIDADE NO TRANSPLANTE

Sabe-se que a sobrevida de vários órgãos transplantados é afetada no contexto da obesidade. Por exemplo, um BMI superior a 30 é considerado como um fator de risco significativo para cicatrização de ferida cirúrgica em receptores de transplante renal (AYNE; ATAS, 2013).

O Sistema de Dados Renais dos Estados Unidos (USRDS) demonstrou uma correlação positiva entre um BMI de 30 ou mais com um atraso na aceitação do enxerto (WEISS et al., 2009). Além disso, pesquisas recentes indicam que doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em receptores de transplante renal, as quais estão relacionadas na maioria das vezes com obesidade (LONČAR et al., 2017). Novamente, receptores de transplante cardíaco e renal com BMI superior a 35 apresentaram pior sobrevida a longo prazo e maiores taxas de rejeição aguda, além do aumento da incidência de complicações renais e T2D (ARMSTRONG et al., 2005; RUSSO et al., 2010).

De maneira semelhante com que acontece nos transplantes de coração, a sobrevida do paciente após o transplante hepático ortotópico é comprometida em receptores com BMI acima de 40 (BOUTAYEB A, 2017; DICK et al., 2009). Interessantemente, a obesidade atua como um fator de risco independente para

morte de receptores que receberam enxertos pulmonares, contribuindo para até 12% dos óbitos no primeiro ano após o transplante (LEDERER et al., 2008). Além disso, é comprovado que pacientes que passaram por perda de peso e modificações no estilo de vida (educação nutricional, dieta, exercício, etc.), tiveram uma redução no quadro de doença renal crônica, o que permitiu esses indivíduos receberem um enxerto renal (CHANG, 2013).

Portanto, sabendo da relação íntima entre obesidade e transplante é importante investigar a função e fenótipo das células do sistema imune que permeiam por ambos os contextos, as quais podem ser cruciais para o desenvolvimento de uma rejeição mais exacerbada.

Neste trabalho, abordaremos as DCs como um fator chave no desenvolvimento do perfil da obesidade e, conseqüentemente, no processo de rejeição exacerbada, o que já vem sendo previamente demonstrado na literatura (MACDOUGALL et al., 2018; NANKIVELL; ALEXANDER, 2010; SILVA et al., 2017; ZLOTNIKOV-KLIONSKY et al., 2015).

1.6 DCS NA OBESIDADE E NO TRANSPLANTE

Há diversos subtipos de DCs (SCHLITZER; GINHOUX, 2014) que podem atuar de forma diferente na rejeição a um enxerto. As cDC1, caracterizadas fenotipicamente como CD11c+MHCII+CD8 α +CD11b- ou CD11c+MHCII+XCR1+CD11b-, e as cDC2, caracterizadas fenotipicamente como CD11c+MHCII+CD11b+CD8 α -, são as mais estudadas no contexto do transplante

experimental (LU et al., 2009; SCHLITZER; GINHOUX, 2014). Além disso, as cDC1 também podem ser caracterizada a partir de células CD11c+MHCII+IRF8+, assim como o fenótipo CD11c+MHCII+IRF4+ pode representar as cDC2 (BROWN et al., 2019; TAMURA et al., 2005). Ambas as cDCs possuem funções primordiais na ativação de linfócitos e, conseqüentemente, no desenvolvimento da resposta imune ao enxerto transplantado. Por exemplo, as cDC1 são apresentadoras eficientes de complexos peptídeos-MHC de classe I (na maioria das vezes através de apresentação cruzada) para linfócito T CD8+, os quais desenvolvem uma resposta diretamente citotóxica ao enxerto (HARPER et al., 2015). Entretanto, foi comprovado que as cDC1, juntamente com a expressão de CD40, têm papel importante na ativação inicial de células T CD4+ *náive*, principalmente no contexto tumoral, o que pode ser aplicado para o contexto do transplante (FERRIS et al., 2020). Por outro lado, as cDC2 são eficientes em apresentar complexos peptídeos-MHC de classe II para linfócitos T CD4+, os quais são ativados e promovem o recrutamento de fagócitos e linfócitos B para realizar suas funções efetoras (BROWN et al., 2019; LU et al., 2009; MERAD; GINHOUX; COLLIN, 2008), processos característicos de rejeição aguda e crônica do enxerto, como mencionado anteriormente.

Ambas cDCs também têm relevância no desenvolvimento da síndrome metabólica instalada na obesidade. Essas células, através do *cross-talking* com adipócitos, podem regular a homeostase de produção de citocinas no tecido adiposo e, conseqüentemente, sua própria homeostase e dos órgãos em contato com esse tecido, o que pode resultar tanto em alteração na sensibilidade à insulina quanto numa inflamação basal (GHOSH et al., 2016; LIM et al., 2013; MACDOUGALL et al., 2018).

Apesar da relevância das DCs presentes no tecido adiposo durante a obesidade (CHO et al., 2016a; SUBSETS et al., 2018), há relativamente poucos estudos que focaram no perfil das DCs presentes nos órgãos linfoides secundários no contexto da obesidade.

Portanto, levando em consideração a importante função das DCs na resposta imune, mais especificamente na apresentação de aloantígenos, torna-se relevante estudar os mecanismos celulares e moleculares relacionados com sua ativação e funções, os quais tem importância na modulação do fenótipo das DCs e das células T.

1.7 MECANISMOS PARA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO E FUNÇÃO DE DCS

Uma das maneiras de manipular o perfil e, conseqüentemente, a ativação de DCs, é promover alterações nos seus mecanismos epigenéticos (MCCAUGHAN et al., 2012; NENCIONI et al., 2007), ou seja, estudar os fatores ligados à remodelação da cromatina que impedem ou possibilitam o acesso ao DNA (KAPLAN et al., 2009; KOSSEL; LECTURE, 2019; LARCH; LAPOINTE; KORNBERG, 1987). Os principais mecanismos epigenéticos são: metilação (HORVATH; RAJ, 2018; TESCHENDORFF; RELTON, 2017), modulação por RNA não codificantes (microRNA, lncRNA, circRNA, etc.) (CHEN; YANG, 2015; DHORNE-POLLET et al., 2019) e modificação em histonas por acetilação e desacetilação (HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009; PICKETT, 2007), o que será discutido mais profundamente aqui, com enfoque em sirtuínas.

Uma atividade enzimática que catalisa a remoção de grupos funcionais acetil de histonas foi descoberta em um extrato de timo de bezerro em 1969 (FUJIMOTO,

1969), e foram funcionalmente relacionadas com famílias de proteínas reguladoras em leveduras (GUARENTE et al., 2000), sendo chamadas de HDACs (histona desacetilases). Essas enzimas, preferencialmente atuam sobre grupos acetis terminais de resíduos de lisina, as quais são classificadas conforme a similaridade da sequência de aminoácidos. A classe I (HDAC1-HDAC4) tem similaridade de sequência com a proteína Rpd3 da levedura. A classe II (HDAC5-HDAC10) tem similaridade de sequência com a proteína Hda1 e Hos de levedura. A classe III (sirtuínas 1-7) tem similaridade de sequência com a proteína Sir2 de levedura (AVALOS; BOEKE; WOLBERGER, 2004).

Experimentalmente, estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que inibidores de histona desacetilase (HDACi) podem aumentar os números e a função supressora de Tregs Foxp3+, promovendo sua produção de células através do remodelamento da cromatina e induzindo a acetilação da própria proteína Foxp3 (ZHANG et al., 2012). *In vitro*, o ácido suberoilânilida hidroxâmico (SAHA®, um tipo de HDACi) reduz a proporção de células Th17 na população isolada de células T CD4+ e diminui as expressões de IL-17A, IL-17F, STAT3 e ROR γ t nestas células. Além disso, SAHA® aumenta a função supressora de células Tregs, aumentando a expressão de CTLA-4, sem afetar a proliferação de células T efectoras (KIM et al., 2019; REDDY et al., 2004). Outro estudo demonstrou que o SAHA® apresenta certo sinergismo com a droga imunossupressora FK506, promovendo uma redução na rejeição de aloenxertos em camundongos (ZHANG et al., 2012).

Com relação as DCs, alguns tipos de HDACi como o ácido valpróico (VPA®) e Entinostat (MS275®) afetam a expressão de moléculas co-estimuladoras e

moléculas de adesão em DCs derivadas de monócitos em seres humanos (NENCIONI et al., 2007). Da mesma forma, a utilização de HDACi promove uma diminuição do marcador CD83, o qual está relacionado com a maturação das DCs (BROGDON et al., 2007). Outros estudos demonstraram que alterações na produção de citocinas em DCs são influenciadas pela funcionalidade das HDACs (LIU et al., 2015a; REDDY et al., 2004).

Como foi visto por Gibson e colaboradores, o butirato promoveu uma diminuição da funcionalidade das HDACs de classe I e II, que leva a uma menor secreção de citocinas como IL-12p40 e IL-6 em DCs derivadas de monócitos humanos (GIBSON, 2000). Em DCs murinas, foi observado que com a aplicação de Tricostatina A (TSA®), uma droga que induz a expressão aumentada de HDACs da classe III, bloqueou a secreção de TNF- α e IL-1 β e reduziu a expressão de TLR3 e TLR4 (ROGER et al., 2011).

Portanto, devido aos estudos realizados anteriormente, HDACs, em especial HDAC3, parecem governar a resposta inflamatória, podendo exacerbá-la ou reduzi-la, dependendo das células e do contexto que se inserem (BROGDON et al., 2007; NGUYEN et al., 2020).

1.7.1 Sirtuínas (HDAC3)

Apesar de existir muitos estudos com inibidores de HDAC em DCs, pouco atuam diretamente nas sirtuínas (SIRTs). Até o presente momento, já foram caracterizadas sete SIRTs, HDACs de classe III. As SIRTs compartilham de 22% a

50% de identidade na sequência de aminoácidos e entre 27% a 88% na identidade nos domínios catalíticos conservados (BRACHMANN et al., 1995). A estrutura da proteína SIRT possui um sítio catalítico constituído por dois domínios, que tem a função de transferir o grupo acetil de resíduos de lisina de uma proteína para uma molécula de adenina oxidada (NAD⁺)(CHANG; GUARENTE, 2014). O maior domínio das SIRTs é a dobra de *Rossmann*, a qual é altamente conservada e característica das enzimas dependentes de NAD⁺/NADH (HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2012). Por outro lado, o menor domínio é dependente do zinco como cofator. Apesar do zinco não atuar diretamente no processo de desacetilação, ele desempenha um papel na integridade estrutural necessária para a reação (BRUNO GHIROTTI et al., 2019; NISOLI et al., 2005). É possível encontrar SIRT1 e SIRT2 no núcleo e citoplasma, SIRT3 no núcleo e mitocôndria, SIRT4 e SIRT5 exclusivamente na mitocôndria, SIRT6 apenas no núcleo, e SIRT7 no nucléolo (FRYE, 1999). Embora as SIRTs tenham sido originalmente identificadas como HDACs, elas podem atuar também em vários outros processos biológicos sobre numerosos substratos não-histona (D. et al., 2013; MA et al., 2019; WAGNER; HIRSCHEY, 2014).

Das sete sirtuínas, a SIRT1 é a que possui a atividade mais robusta de histona deacetilase e tem sido extensivamente estudada em diferentes contextos (CANTÓ et al., 2009; D. et al., 2013; MA et al., 2019; NISOLI et al., 2005; SEPHAROSE et al., 2005). Além disso, seguindo os dados de SIRTs em DCs disponibilizados até o momento, aparentemente SIRT1 parece ter um papel de maior relevância na modulação do perfil das DCs quando comparado a outras células do sistema imune (LIU et al., 2015b).

Com relação as DCs, observou-se que a SIRT1 estava mais positivamente regulada em DCs infectadas com vírus sincicial respiratório (RSV)(ELESELA et al., 2020; OWCZARCZYK et al., 2015). Após a infecção pelo RSV, as DCs tratadas com EX-527 (inibidor seletivo de SIRT1), com RNA interferente (iRNA) para SIRT1 ou DCs de camundongos com *knockout* condicional para SIRT1, mostraram expressão gênica aumentada de citocinas pró-inflamatórias e autofagia atenuada (OWCZARCZYK et al., 2015). De maneira similar, camundongos *knockouts* para SIRT1 em células mielóides desenvolvem lesões articulares mais severas em modelo de artrite. Além disso, foi visto que as DCs desses animais possuíam um aumento da expressão de CD86 e CD80 (WOO et al., 2016). O grupo do Prof. Hans Acha-Orbea demonstrou que outras sirtuínas, como SIRT3, parecem não ter um efeito crítico para as DCs responderem a infecções por bactérias e fungos (CIARLO et al., 2017). Porém, animais com deficiência em SIRT2 possuem funções fagocíticas aumentadas e, conseqüentemente, protegem mais eficientemente os indivíduos de infecções crônicas por estafilococos (FRYE, 1999). SIRT1 em DCs está intimamente ligada a regulação de alguns fatores de transcrição, por exemplo, sabe-se que SIRT1 altera o funcionamento do regulador de interferom do tipo 1 (IRF1), e isso leva a menor polarização de células Th17 num modelo de autoimunidade (WOO et al., 2016). Em acréscimo, SIRT1 parece regular negativamente fator indutor de hipóxia 1 alpha (HIF1- α) em DCs, o que conduz a uma menor secreção de IL-12p40 e a uma maior secreção de TGF- β (LIU et al., 2015a).

1.7.2 Sirtuína 1 na resposta imune e metabolismo

A SIRT1 tem um grande potencial de modular a cromatina nas regiões das histonas H3K9, H3K14, H3K56, H4K16 e H1K26 (CHANG; GUARENTE, 2014). Essa HDAC3 já foi encontrada nas células dos músculos lisos, adipócitos, hepatócitos, além de várias células do sistema imune (BEIER et al., 2012; CHALKIADAKI; GUARENTE; GUARENTE, 2012; ELESELA et al., 2020; MIYAZAKI et al., 2014), a qual está ligada à atividade da adenosina monofosfato-quinase (AMPK) em um mecanismo bidirecional que regula a fisiologia celular, principalmente em condições de limitação de energia (LO et al., 2019). Além disso, a SIRT1 atua em fatores de transcrição importantes na regulação do metabolismo energético, como *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha* (PGC-1 α) e *Forkhead Family Of Transcription Factors 1* (FOXO1) e 3 (FOXO3) (LI et al., 2007; SEPHAROSE et al., 2005). SIRT1 está relacionada com a expressão e função de proteínas envolvidas na tolerância ao estresse (p53, HIF1- α), no reparo do DNA (via NBS1, PARP1, Ku70 e WRN) e na inflamação (NF- κ B), o que enfatiza a importância dessa molécula na resposta imune e no metabolismo celular (ALVAREZ et al., 2012; AVALOS; BOEKE; WOLBERGER, 2004; LO et al., 2019; PICARD et al., 2010; YEUNG et al., 2004).

Dessa forma, SIRT1 consegue influenciar a biogênese mitocondrial, o estresse oxidativo e a diferenciação celular, presentes em doenças neurodegenerativas (CHOI et al., 2019; ZHANG et al., 2016), câncer (HERRANZ et al., 2010; JUNG et al., 2020; LIU; MCCALL, 2013) e durante uma inflamação crônica (CHALKIADAKI; GUARENTE; GUARENTE, 2012; YOON et al., 2015).

Demonstrou-se que a administração oral de compostos ativadores de SIRT1, como resveratrol, promoveu efeitos benéficos em indivíduos que tinham uma dieta rica em gordura, sem apresentar grandes efeitos tóxicos (BAUR et al., 2006; KONINGS et al., 2014). Outro dado interessante que conecta SIRT1 com o metabolismo celular é o fato dessa HDAC promover a mobilização de ácidos graxos em adipócitos por reprimir as atividades de PPAR- γ (MACDOUGALL et al., 2018), dessa forma a adipogênese é atenuada e animais em dieta hiperlipídica têm uma melhor sobrevida na presença de uma expressão aumentada de SIRT1. Ainda, a restrição calórica aumenta consideravelmente a expressão de SIRT1 (GUARENTE, 2012), o que demonstra, portanto, uma conexão de SIRT1 com o metabolismo de lipídeos e ingestão de calorias no geral.

SIRT1 é amplamente descrita como um regulador da atividade mitocondrial, todavia há poucos relatos relacionando essa HDAC3 com seu potencial de regular vias adjacentes a mitocôndria. Por exemplo, o metabólito hormonal de vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D3), que se liga ao receptor de vitamina D (VDR) regula diversos processos de sinalização, interferindo no fenótipo e na função das células (BOOTH et al., 2016; LIN, 2016). O VDR possui modificações pós-traducionais de acetilação que são governadas por SIRT1, a qual tem o potencial evitar o *feedback* negativo entre o 1,25 dihidroxivitamina D e VDR proveniente da acetilação (SABIR et al., 2017).

Outro ponto interessante é a relação da geração de NAD⁺ com atividade de SIRT1 (AVALOS; BOEKE; WOLBERGER, 2004; CANTÓ; MENZIES; AUWERX, 2015; PRICE et al., 2012). Há duas vias principais para geração dessa coenzima: a

biossíntese catabólica de NAD⁺ via degradação de triptofano (biossíntese *de novo* de NAD⁺) e a via de salvamento NAD⁺ (EVANS et al., 2002; LIU et al., 2018; STONE; DARLINGTON, 2002). Ambas as vias têm sido relatadas como essenciais na produção de NAD⁺ para suprimir o funcionamento de várias etapas de vias metabólicas e de enzimas, como as sirtuínas (MINHAS et al., 2019; PRASAD et al., 1999; PRICE et al., 2012).

O triptofano é clivado por indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) ou triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) e dá origem a quinurenina, que por sua vez segue sendo clivado por uma variedade de enzimas que, ao final, gera NAD⁺ (BADAWY, 2017). A via de salvamento de NAD⁺ é uma via cíclica de restauração de NAD⁺, que ocorre principalmente através de três precursores de NAD⁺: NAMN, NMN e NAM, sendo que sirtuínas atuam diretamente na conversão de NAD⁺ em NAM (LIU et al., 2018). A mudança da via de salvamento NAD⁺ para a via de biossíntese de triptofano tem potencial de induzir tolerância, evidenciando, portanto, a importância dessas vias na regulação de fenótipos celulares (ZHANG et al., 2019). Além disso, essa a via do triptofano promove tanto a produção e quanto secreção de quinurenina, que por sua vez tem um grande potencial tolerogênico no microambiente, principalmente pela geração de células Treg Foxp3⁺ (ELKHAL et al., 2016; RAD POUR et al., 2019). Sendo assim, essas vias podem ser peças-chave na modulação de SIRT1 e como essa HDAC modula o fenótipo das células, principalmente em DCs, as quais têm sido descritas como uma das principais células com grande atividade da via do triptofano (MONDANELLI et al., 2017; NOAKES, 2015).

Tendo em vista que ativação genética ou farmacológica da SIRT1 pode beneficiar inúmeras doenças inflamatórias em modelos murinos (CHOI et al., 2019; GANESAN et al., 2017; LIU; MCCALL, 2013; YOON et al., 2015) e aliado ao fato de que pouco tem se avaliado sobre o papel da SIRT1 no metabolismo de células imunes, como nas DCs, nosso trabalho se insere nesta perspectiva. As DCs são células importantes para indução da resposta imune ao aloenxerto, parecem desenvolver papel crucial no contexto da obesidade, neste projeto formulamos a hipótese de que SIRT1 regula diretamente a expressão citocinas pró-inflamatórias e interfere na apresentação de antígenos e no metabolismo das DCs. Como consequências destas modulações, a SIRT1 influencia na diferenciação, ativação e proliferação de subtipos de células T CD4+, as quais determinarão a aceitação ou a rejeição de um enxerto, principalmente no contexto da obesidade.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a função de SIRT1 na função e no fenótipo de DCs e o impacto dessa modulação no contexto do transplante de pele e/ou na obesidade experimental.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Inicialmente, usando um modelo clássico de estudo *in vitro* para avaliar a função e fenótipo de DCs, nós procuramos:

- A. Caracterizar a expressão e o papel SIRT1 no fenótipo e nas funções de DCs de linfonodos drenantes e células dendríticas da medula óssea (BMDCs), provenientes de animais magros e obesos;
- B. Diferenciar BMDCs de animais magros e obesos para avaliar o perfil metabólico e fenotípico dessas células na presença de resveratrol (RES) e Ex-527 (6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-Carbazol-1-carboxamida);
- C. Medir a atividade de SIRT1 em DCs isoladas de linfonodos drenantes e em BMDCs; e
- D. Avaliar o perfil de expressão proteica de células T CD4+ na presença de BMDCs de animais magros e obesos, com e sem RES ou EX-527.

Uma vez observado o impacto da expressão diferencial de SIRT1 no fenótipo e função das DCs de animais magros e obesos, avaliaremos como a ausência específica dessa HDAC em DCs, através da deleção condicional de *Sirt1* em células dendríticas (SIRT1^Δ), impacta a resposta imune de camundongos obesos e transplantados. Para isso, nós objetivamos:

- A. Avaliar o peso, tolerância a glicose, e resistência insulina dos camundongos SIRT1^Δ durante a obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- B. Avaliar a sobrevivência dos enxertos em diferentes condições, as quais envolvem camundongos WT e SIRT1^Δ magros ou obesos, sem e com transplante; e
- C. Avaliar o perfil metabólico e fenotípico de BMDCs nas diferentes condições citadas acima no tópico 1.

3. MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os animais com deleção condicional para *Sirt1* em DCs foram chamados de SIRT1^Δ. O *background* dos animais é C57BL/6J e foram utilizados seguindo o genótipo; *CRE*^{+/-} *Itgax* flox^{+/+} para os animais com deleção de SIRT1 em DC; Enquanto os controles foram selecionados pela ausência de CRE: *CRE*^{-/-}*Itgax* flox^{+/+} (SIRT1^{fl/fl}). Apenas animais machos foram utilizados para os experimentos. Tanto os animais SIRT^Δ, quanto os C57BL/6J foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), sob o Comitê de Ética em Uso de Animal (CEUA) do ICB (n° 8027280518). Os mesmos foram mantidos em condições SPF (do inglês, *specific pathogen free*) com temperatura controlada (25°C), ciclo claro/escuro (12h/12h) e com água e ração à vontade. Cada experimento realizado foi composto de no mínimo 3 animais e no máximo 9 animais por grupo, acompanhado de 2-3 repetições experimentais.

3.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Para o teste de tolerância à glicose (GTT), nós injetamos via intraperitoneal, 1g/kg de glicose (diluída em PBS 1X estéril) de acordo com o peso corporal do animal (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) após 12 horas de jejum. A concentração de glicose no sangue foi aferida nos animais nos tempos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose, utilizando tiras de glicemia (Accu-chek®, Basel, Suíça). Para o teste de tolerância à insulina (ITT), os animais receberam 1U/kg de insulina regular humana (diluída em PBS 1X estéril) (Thermo Fisher Scientific™,

Massachusetts, EUA) por via intraperitoneal, após 8 horas de jejum. A avaliação da glicemia dos animais nos mesmos intervalos de tempo procedeu-se da mesma forma que foi realizada para o GTT.

3.3 MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA

Para induzir obesidade os animais (4 semanas de idade) foram submetidos à dieta padrão de 20% ou hiperlipídica 60% de lipídeos/kcal (Rhooster™, São Paulo, Brazil) com 3g/kg de L-cistina, 2,5 g/Kg de bitartarato de colina, 10 g/Kg de 10 g/Kg de mix vitaminas, 35 g/Kg de mix de minerais G, 100 g/Kg de sacarose, 50 g/Kg de celulose microfina, 115,5 g/Kg de amido de milho, 132 g/Kg de amido dextrinizado, 200 g/Kg de caseína, 315 g/Kg de banha suína e 35 g/Kg de óleo de soja por 12 semanas. Após administração da dieta durante o período determinado, o estabelecimento da obesidade e da síndrome metabólica foi avaliado através do monitoramento do ganho de peso, bem como através de testes de GTT e ITT.

3.4 GERAÇÃO DE BMDCS DE CAMUNDONGOS.

Para verificar a presença e investigar o papel da SIRT1 em DCs *in vitro*, foram geradas DCs da medula óssea isoladas de fêmur e tibia de camundongos machos magros e obesos. Após a eutanásia dos animais foram coletados os fêmures e as tíbias. Os músculos, cartilagens e gorduras foram removidos dos ossos, os quais foram mantidos em PBS 1X com 2% de SFB (Gibco®, Massachusetts, USA), no gelo picado (4°C), até serem transferidos para dentro de um fluxo laminar. Dentro do

fluxo, tanto os fêmures quanto as tíbias foram embebidos com álcool 70%, e, posteriormente, as extremidades dos ossos foram superficialmente cortadas com o auxílio de tesoura e pinça estéreis. Após os cortes, com auxílio de uma seringa BD™ (Califórnia, EUA) 5 mL Luer-Lok™ Tip (Califórnia, EUA) acoplada a uma agulha BD™ (Califórnia, EUA) 0,45 X 13 mm (26G X ½”), foi injetado dentro de cada osso 2,5 mL de PBS 1X com SFB 2% estéril. O volume injetado era imediatamente filtrado por um *Cell Strainer* (Corning®, Nova Iorque, EUA) de 70 µM/Nylon apoiado sob um tubo Falcon® (Nova Iorque, EUA) de 50 mL, utilizado para conteúdo. O volume adquirido foi centrifugado à 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e ao botão de células foi adicionado 1 mL tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃ e 0,1 mM EDTA), homogeneizado e incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente. Na etapa seguinte foram adicionados 5 mL de PBS com 2% de SFB estéril, para neutralizar o tampão de lise de hemácias. As células foram novamente centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado novamente e o botão celular foi suspenso com 5 mL de IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium* - Gibco®, Massachusetts, EUA) com 10% de SFB e 1% de Penicilina e Estreptomicina (Gibco®, Massachusetts, USA). Uma alíquota de 2µL de amostra foi diluída 20X em corante de viabilidade *Trypan Blue* para contagem do número de células, a qual ocorreu através do microscópio e uma câmara de Neubauer, com a exclusão de células mortas. Por fim, 1,5x10⁶ células foram colocadas por poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de IMDM com 10% de SFB com 1% de Penicilina e Estreptomicina, além de 20ng/ml de GM-CSF (*Recombinant Murine GM-CSF* - Peprotech®, Nova Jersey, EUA). No dia 3 foi removido metade do volume do meio de cultura, o qual foi reposto com 1mL de IMDM fresco

com o dobro da concentração de GM-CSF do dia 0. Após as BMDCs serem geradas por completo no dia 6, os tratamentos necessários para buscar os objetivos do projeto foram aplicados no dia 7.

3.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DAS BMDCS COM RESVERATROL E EX-527

As drogas farmacológicas resveratrol (catálogo: R5010-100MG, Sigma-Aldrich® Missouri, EUA) e EX-527 (catálogo: E7034-5MG, Sigma-Aldrich® Missouri, EUA) foram ambas diluídas em DMSO e armazenadas a -20°C, conforme instruções do fabricante. Teste de dose resposta, variando tempo e concentração (**Anexo 1A e 1B**), foram realizados para determinar a dose que utilizaríamos no trabalho. Após os testes prévios, a concentração de 100 µM de resveratrol e a concentração de 20 µM foram escolhidas para os demais experimentos subsequentes, por apresentarem maior modulação da expressão de SIRT1 (aumento com resveratrol e inibição com o EX-527) sem prejuízo na viabilidade celular.

3.6 IMUNOFENOTIPAGEM E AGRUPAMENTO VIA TNSE

Para realizar a imunofenotipagem de BMDCs e DCs identificadas *in vivo* de animais magros e obesos, utilizamos os marcadores fenotípicos descritos na **Tabela 1**. Sendo que número de células foi ajustado igualmente entre as amostras de cada grupo experimental (1X10⁶ células por amostra), as quais foram adquiridas pelo equipamento BD FACSCanto™ II Cell Analyzer e BD LSRFortessa™ Flow Cytometer (Califórnia, EUA) . Os dados foram analisados pelos *softwares* BD FACSDiva™ e BD

FlowJoXT™ (Califórnia, EUA). Todos os anticorpos mencionados foram utilizados na diluição de 1:200 µL anteriormente padronizados, seguindo uma titulação prévia realizada pelo nosso laboratório.

O *clustering* das subpopulação de DCs foi realizada a partir do *plug-in* *tense*™ disponibilizado pelo software BD FlowJoXT™. As amostras foram concatenadas via *Downsample V3 plug-in* na mesma quantidade de eventos/DCs viáveis (5000) por amostra. O número de interações foi de 2000, assim como o nível de perplexibilidade foi configurado para 80.

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados

Fluórocromo	Anticorpo	Clone	Fornecedor
AF700	anti-I-A/I-E	M5/114.15.2	eBioscience™
Percp-cy5.5	anti-CD80	16-10A1	BD™
PE-Cy7	anti-CD86	GL1	BD™
PE	anti-CD40	3/2.G	BD™
BV421	anti-CD11c	HL3	BD™
APC-Cy7	anti-CD11b	M1/70	BD™
BV786	anti-CD8α	53-6.7	BD™
FITC	anti-F4/80	B8	BD™
FITC	anti-CD4	H129.19	BD™

PE-Cy7	anti-CD25	3C7	Biolegend™
BV711	anti-CD45	A20	Biolegend™
PE	anti-IL12p40	JES6-5H4	Biolegend™
APC	anti-IFN γ	XMG1.2	BD™
BV605	anti-B220	C57.3	eBioscience™
FITC	anti-SIRT1	19A7AB4	Abcam®
PEC-cy7	anti-CD44	IM7	BD™
AF700	anti-CD62L	MEL-14	BD™
PE	anti-CD103	2E7	BD™
Não conjugado	anti-PPAR γ	81BB	Cell Signaling
Não conjugado	anti- β -catenin	D2U8Y	Cell Signaling
AF647	anti-IDO1	V50-1886	BD™
PE	CD64	X54-5/7.1	BD™
PE	Ly-6G	1A8	Biolegend™

3.7 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total das células foi extraído com o reagente TRIzol™ (Invitrogen™ – Texas, EUA). Primeiramente foi adicionado 1000 μ L de TRIzol™ nas células, seguido

de uma incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, para posterior adição de 200 μL de clorofórmio, seguida de uma agitação de 15 segundos e nova incubação de 3 minutos, a qual foi seguida de uma centrifugação à 1200 rpm por 15 minutos à 4 °C. Após, foi coletada a primeira fase do conteúdo (sobrenadante transparente onde contém o RNA), o qual foi transferido para um novo tubo de 1.5 mL, adicionado 500 μL de isopropanol, homogeneizado por vortex e centrifugado por mais 10 minutos a 1200 rpm e 4°C. Posteriormente, foi realizado uma lavagem com 1000 μL de etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 7500 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado. Após o tubo ter ficado secando em temperatura ambiente por 20 minutos foi adicionado 15 μL de água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPEC®), para que as amostras fossem quantificadas pelo equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA) e armazenadas em freezers de -80°C até a sua utilização.

3.8 SÍNTESE DE CDNA (DNA COMPLEMENTAR)

A síntese de cDNA a partir de 2000 ng de RNA total foi realizada pelo Kit *M-MLV Reverse Transcriptase System* oferecido pela Promega™ (Wisconsin, EUA). Em um tubo de 0.2 mL foi colocado 2.000 ng de RNA, 2,5 μL de *DNase*, 5 μL de 10X *Reaction Buffer* e 1 μL de *DNase-RNA free* em cada amostra, para digestão de DNA contaminante. As amostras foram colocadas no Termociclador *Mastercycler5* da Eppendorf™ (Hamburgo, Alemanha) com uma ciclagem de 30 minutos à 37 °C e posteriormente foram incubadas por 5 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras retornaram novamente para o termociclador em uma ciclagem de 10

minutos por 65 °C e mais 5 minutos no gelo. Por fim, foi aplicado uma mistura contendo 1 µL BSA (20 ug/mL), 10 µL de M-MLV Buffer 5X, 10 µL de dNTP, 2 µL de Oligo DT e 2 µL transcriptase reversa, para realização da última ciclagem no termociclador de 1 hora à 37°C seguida de uma etapa de 65°C por 10 minutos. Ao final, as amostras foram armazenadas a - 20 °C e diluídas 20X até serem utilizadas.

3.9 QPCR

A qPCR em tempo real (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) foi realizada a partir do uso de 5 µL de *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* da Applied Biosystems™ (Califórnia, EUA), 2 µL de água específica para uso em biologia molecular da Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA), 0,5 µL de cada *primer* (500 nM), *Foward* e *Reverse* da IDT™ (Washington, EUA) e por fim, 2 µL da amostra diluída 20X. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 well *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate Strips* Applied Biosystems™ no aparelho QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System Applied Biosystems™. As sequências dos *primers* dos genes analisados foram: ***Sirt1*** F: 5'-AAACAGTGAGAAAATGCTGG-3', R: 5'-GGTATTGATTACCCTCAAGC-3'; pro-***IL-1b*** F: 5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3', R: 5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'; ***IL6*** F: 5'-TACCACTTCACAAGTCGGAGGC-3', R: 5'-CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC-3'; ***IL12b*** F: 5'-GGCCATGAGGCTGGATCTC-3', R: 5'-AACATTTGAATCCTGCAGCCA-3'; ***IL12a*** F: 5'-TTTTCTGGCATCTCCCCTCGTG-3', R: 5'-TGGGTGGGTCAGGTTTGATGATG-3'; ***Ifna*** F: 5'-GAAATTCCTGATCCAGACAAAAC-3', R: 5'-ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG-3'; ***Ifnb*** F: 5'-CAACTTGCTTGGATTCCCTACAAAG-3', R: 5'-TATTCAAGCCTCCATTCAATTG-3'; ***Tnfa***

F: 5'-TGTGCCCCGTATCCAGTGT-3', R: 5'-CGGATCCTTTGCAAGCAGAA-3', **Il10** 5'-ATTTGAATTCCCTGGGTGAGAAG-3', R: 5'-CACAGGGGAGAAATCGATGACA-3' **Tgfb1**
 F: 5'-GCAGCACGTGGAGCTGTA-3'; **Il35 (Ebi3)** F: 5'-GTTCTCCACGGTGCCCTA-3', R: 5'-CGGCTTGATGATTCGCTC-3'; **Ido1** 5'-AGGATCCTTGAAGACCACCA-3', R: 5'-CCAATAGAGAGACGAGGAAG-3'; **Bactin** F: 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTG-3', R: 5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'. Todas as sequências de *primers* foram adquiridas através da empresa IDT™ na concentração de 100 nM e diluídas de modo padrão a 10X para uso, as quais foram previamente tituladas, chegando no padrão de 0,5 µL em 10 µL de reação final, com a concentração de 500 nM de cada primer do par.

3.10 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Com o objetivo de extrair o conteúdo proteico de BMDCS dos camundongos magros e obesos, foi utilizado 500 µL de solução RPPA Lysis Buffer 1X (Merck™, Darmstadt, Alemanha) com inibidores de fosfatase e protease (1 comprimido de cada iibidor para 10ml de RPPA) (Roche®, Basel, Suíça) a cada 2×10^6 células. A solução de RPPA era composta por: 0.5M de Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M de NaCl, 2.5% de ácido desoxicólico, 10% de NP-40, 10mM de EDTA. Após a adição da solução nas células em *pellet*, as mesmas foram incubadas por 15 minutos em gelo picado (4°C) para futura quantificação pelo kit de BCA seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fischer Scientific™, Massachusetts, EUA), finalizando com a estocagem das amostras em -80 °C.

3.11 ELISA

A medida das citocinas IL-12p70, IL-12p40, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 e TGF- β foi realizada usando os Kits R&D System[®] ELISA DuoSet[®] sanduiches (Wittenberg, Alemanha) e BD[™] ELISA set (Califórnia, EUA), seguindo as orientações dos fabricantes. A leitura da absorbância foi realizada no aparelho Synergy HTX[®] da Biotek (Vermont, EUA) no comprimento de onda 542nm.

3.10 EXTRAÇÃO DE DNA PARA GENOTIPAGEM

A extração do DNA foi realizada a partir da retirada de uma pequena parte da orelha de cada animal, a qual foi mantida dentro de um tubo Eppendorf[™] (Hamburgo, Alemanha) de 600 μ L, que permaneceu em gelo picado (4°C). Posteriormente foi adicionado 40 μ L de NaOH (2mM) para o futuro aquecimento a 94°C na rotação de 350 rpm por 1h no *Thermoblock* Eppendorf[™] (Hamburgo, Alemanha). Após esse tempo foi completado à solução 40 μ L de TriHCl (0,05nM). Por fim, todos os tubos passaram por um *vortex* e por um *short-spin* para ser estocado na geladeira à 4°C.

3.12 GENOTIPAGEM DOS ANIMAIS *CRE-LOX*

Para verificar a presença do genótipo desejado em cada geração de animais SIRT1, foi realizado a genotipagem (PCR convencional) dos mesmos. Para determinar se o animal realmente possuía o gene de CRE em CD11c (mais

precisamente na região promotora do gene *Itgax*) foi feito um mix para todas as amostras, o qual contém 5 μ L de MyTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix da Merck® (Nova Jersey, EUA) mais 1 μ L de cada primer (**oIMR7841** F: 5'-ACTTGGCAGCTGTCTCCAAG-3'; **oIMR7842** R: 5'-GCCAAC ATCTTCAGGTTCTG -3'; **oIMR8744** /F: 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3; **oIMR8745** 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3') e 2 μ L de água DEPEC®. Dessa forma cada tubo com 2 μ L de amostra contém 11 μ L de mix mais primers (solução final de 13 μ L). De forma semelhante, para a verificar se o camundongo é SIRT1^Δ, outra PCR foi realizada com o mesmo mix e a mesma quantidade de amostra, porém foi usado dois *primers* somente (**oIMR7909** F: 5'-GGTTGACTTAGG TCTTGTCTG-3'; **oIMR7912** R: 5'-CGTCCCTTGTAAATGTTTC CC-3'). Para realizar a reação de PCR foi utilizado o termociclador *MasterCycle5* com as temperaturas, tempos e análises padronizados para cada genotipagem disponibilizadas pela empresa The Jackson Laboratory™ (Harbor, EUA). Logo após, foi realizado o preparo de um gel de agarose 3% com *TAE* buffer 1X e uma corrida de eletroforese para visualizar as bandas de DNA e, por fim, separar os animais de interesse. O genótipo ideal para os experimentos está ilustrado nos géis abaixo (**Figura 1A e 1B**).

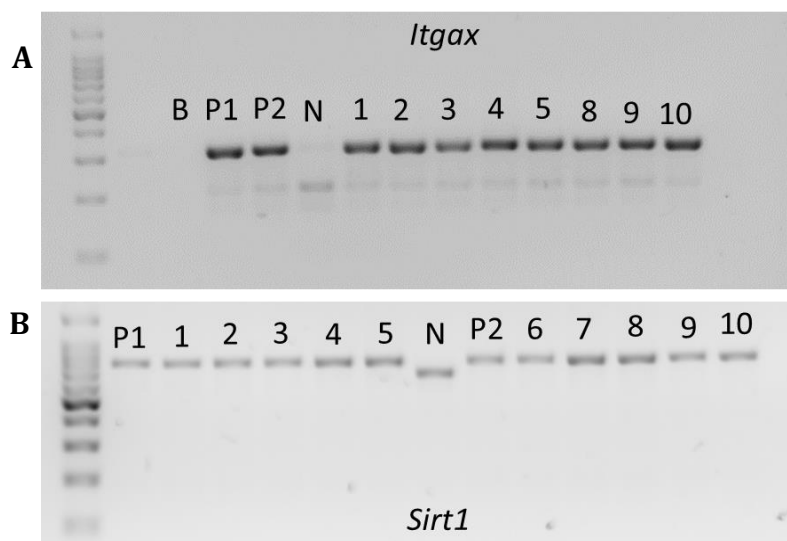


Figura 1 - Genótipo dos animais com deleção condicional de SIRT1 em DCs (*Itgax/CD11c*), indetificados como SIRT1^A.

Genotipagem para *Itgax* contendo amostras de DNA da cauda de animais SIRT1^A (1-10), sendo que os animais positivos devem conter duas bandas (*tgax*: ~313 bp e *Internal control*: ~200bp) **(A)**. Genotipagem para *Itgax* contendo de amostras de DNA da cauda de animais SIRT1^A (1-10), sendo que os animais homozigotos devem conter uma banda superior (homozigoto: ~810 bp), os animais WT devem conter uma banda inferior (WT: ~700 bp) e os heterozigotos com as duas bandas **(B)**. Todas as genotipagens continham os controles positivos (P1 e P2), negativo (N) e brancos (B). precisa ilustrar o marcador de peso molecular e dizer se ele é de 100 ou 200 bp.

3.13 CO-CULTIVO ENTRE BMDCS PULSADAS COM OVA E CÉLULAS T CD4+ NAIVE DERIVADAS DE ANIMAIS OT-II

Inicialmente as BMDCs foram geradas como anteriormente descrito, sendo que no dia 6 as células foram tratadas com Resveratrol (100 μ M) ou EX-527 (20 μ M) e com Ovalbumina (OVA) Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA) na concentração de 0.1 mg/mL previamente filtrada, através de um filtro de 0,45 μ m em PBS 1X. No dia 7, as BMDCs foram retiradas da placa de 6 poços, isoladas por EasySep™ Mouse CD11c Positive Selection Kit II Stem Cell™ (Los Angeles, EUA) e recolocadas em uma placa de 96 poços de fundo U, com 25×10^4 células por poço. Com os linfócitos T CD4+ *naïve* (CD4+62DL^{high}) devidamente isolados dos linfonodos e do baço de animais OT-II pelo EasySep™ Mouse Naïve CD4+ T Cell Isolation Kit da Stem Cell™ (Los Angeles, EUA), foi realizada a adição do CellTrace™ Violet Cell Proliferation da Thermo Fisher Scientific™ (Massachusetts, EUA) na concentração de 5 μ M. As células foram posteriormente incubadas a 37 °C, 5% de CO₂, por 20 minutos em 1 mL de meio RPMI 1640 completo, ou seja, contendo 5% de SFB, 1% de penicilina, streptomocina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 25 mM de HEPES e diluição de 1:1000 de 2- β -Mercaptoetanol (Gibco® de Massachusetts, USA). Feito isso, foi adicionado a placa de 96 poços já contendo as

25×10^4 BMDCs, 1×10^5 linfócitos T CD4+ *náive* por 3 dias. No dia 8, os poços contendo ambas as células foram submetidos ao acréscimo de 50 ng/mL de PMA, 1 µg/mL de ionomicina e 1 µg/mL solução de brefeldina A BD™ (Califórnia, EUA) e posteriormente foram incubadas durante 5 horas em 37°C a 5% de CO₂. A proliferação dos linfócitos T CD4+ e a produção de citocinas foram analisadas por citometria de fluxo, através da BD FACSCanto™ II Cell Analyzer e BD LSRFortessa™ Flow Cytometer (Califórnia, EUA) . Os dados foram analisados pelos *softwares* BD FACSDiva™ e BD FlowJoXT™ (Califórnia, EUA).

3.14 TRANSPLANTE DE PELE

Animais F1 (H-2d/b, oriundos do cruzamento entre C57B/6j e Balb/c) foram utilizados como doadores de transplante de pele a animais com fundo C57B6/J. O transplante foi realizado a partir de uma adaptação da técnica descrita por Markees et al. 1997.(MARKEES et al., 1998) Os camundongos doadores foram eutanasiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (375 mg/Kg) e xilazina (37,5 mg/Kg) e, com a ajuda do bisturi, a pele do dorso foi removida, cortada em quadrados de 1 cm² com os cantos sendo abaulados. Os camundongos receptores foram anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (100 mg/kg), e tiveram suas costas depiladas e assepsiadas por etanol 70%. Uma "cama" para o enxerto dorsal foi preparada removendo uma área da epiderme e derme ao nível do músculo intrínseco, no tamanho do enxerto. Os enxertos foram colocados na "cama" cobertos com curativo. A sobrevivência do enxerto foi monitorada diariamente por avaliação tato-visual. O enxerto aceito foi definido a partir do dia em que o enxerto foi

incorporado no camundongo e o dia da rejeição foi definido quando 100% do enxerto mostrou sinais de necrose.

3.15 CAPTAÇÃO DE GLICOSE

Para o experimento de captação de glicose, as BMDCs foram incubadas com 2-NBDG (análogo fluorescente de glicose, FITC), seguindo as instruções do fabricante 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (Thermo Fisher®, Massachusetts, EUA). Após lavagem, a captação de 2-NBDG foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCanto™ II) e analisada por BD FlowJoX™.

3.16 ENSAIO DE DOSAGEM DE LACTATO E GLICOSE

As dosagens de lactato e glicose do sobrenadante de BMDCs foram realizadas com ajuda de testes enzimáticos da Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brasil) seguindo o protocolo estabelecido pelo fornecedor. A absorbância foi obtida a partir do equipamento Synergy HTX® da Biotek (Vermont, EUA) no comprimento de onda 542nm ou 550 nm

3.17 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS (LC-MS)

A quantificação dos metabólitos do triptofano foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo LC-MS/MS (QqQ). O equipamento utilizado é composto por Bombas LC 1250 Bin Pump VL, auto-injetora 1260 HiP ALS acoplados ao espectrômetro de massas 6460, todos da Agilent Technologies™ (Massachusetts, EUA). As análises foram realizadas em *software* MassHunter™ e os dados coletados no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). Para o preparo das amostras, o sobrenadante das culturas (500 µL) foi transferido a um microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de metanol: acetona (1:1) com 0,1% de ácido acético. Após adição das amostras, 10 µL de um mix de padrões internos (MLT-D4 e Trp-D5) para os analitos estudados foi adicionado ao microtubo. Posteriormente, homogeneizamos em vórtex por 1 min e então armazenamos essas soluções por meia hora a -20°C para precipitação das proteínas do meio de cultura. Após a incubação, os microtubos foram submetidos a centrifugação a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante dos microtubos foi transferido para novos microtubos e secos em *Speedvac*®. Ao final da secagem, as amostras foram reconstituídas em 100 µL de uma mistura de água:metanol (9:1) para então serem analisadas por cromatografia líquida.

3.18 SEAHORSE XF96

Um dia anterior ao experimento, 200µL de Agilent Seahorse XF Calibrant (Massachusetts, EUA) foi adicionado em cada poço do *cartridge* (Massachusetts, EUA), o qual foi hidratado e incubado durante 24h a 37°C sem CO₂.

As taxas de consumo de oxigênio (OCR - *oxygen consumption rate*) foram quantificadas em um analisador de fluxo extracelular XF-96 (*XF-96 Extracellular Flux Analyzer* - Seahorse®, Bioscience) para se obter indicações da respiração mitocondrial. Para isso, BMDCs positivamente selecionadas pela coluna EasySep™ Mouse CD11c Positive Selection Kit II Stem Cell™ (Los Angeles, EUA), de animais magros e obesos, com e sem Resveratrol (100 µM/24h) ou EX-527 (20 µM/24h), foram plaqueadas na placa específica para realização dos ensaios do *XF-96 Extracellular Flux Analyzer*, a qual possuía 96 poços com 50 000 células/poço contendo 200µL do Agilent Seahorse XF RPMI Medium (Massachusetts, EUA), suplementado com 1mM de L-glutamina, de Piruvato e 10 mM de glicose (Gibco®, Massachusetts, EUA). Posteriormente, após calibração do equipamento *XF-96 Extracellular Flux Analyzer*, foi realizado a injeção das drogas oligomicina a 1 µM, CCCP a 5 µM (*Carboxy-carbonyl cyanide phenylhydrazone*); e antimicina-A/rotenona a 1µM. Desse modo foi possível obter, em tempo real, a respiração basal, vazamento prótons, capacidade de reserva, fosforilação oxidativa e capacidade respiratória máxima das células em estudo.

As BMDCs com os mesmos tratamentos farmacológicos para SIRT1, as quais estavam mantidas em 200µL/poço do Agilent Seahorse XF RPMI Medium (Massachusetts, EUA) suplementado com 1mM de L-glutamina e 10 mM de glicose

(Gibco®, Massachusetts, USA), passaram pelo *XF-96 Extracellular Flux Analyzer* para mensuração das taxas de acidificação extracelular (ECAR - *extracellular acidification rate*) com as seguintes drogas: glicose (100 mM), oligomicina (1 µM) e 2-DG (50 mM). Com isso, foram calculados os índices de glicólise, capacidade glicolítica e reserva glicolítica.

Os valores foram padronizados de acordo com o número de células tanto para os experimentos de OCR quanto de ECAR. Além disso, todos os outliers foram retirados pelo teste específico fornecido pelo software *GraphPad Prism 6®/8®*.

3.19 WESTERN BLOT

As amostras de proteínas previamente quantificadas foram submetidas ao corante Lemille Blue 4X e 0,015g de DDT a cada 100 µL de corante. Posteriormente as amostras foram desnaturadas através do aquecimento (94°C/1h) *Thermoblock Eppendorf™* (Hamburgo, Alemanha). Com 25 µg de cada amostra desnaturada, foi realizada uma separação eletroforética usando um gel SDS-PAGE, por 90 min à 120v. Na etapa seguinte, os géis contendo as amostras foram transferidos (*semi-dry*) para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Chicago, EUA) através do programa padrão/*standard* do *Trans-Blot® Turbo™* Sytem da BIORAD (Califórnia, EUA). Após transferência, as membranas foram bloqueadas durante 1h em temperatura ambiente (TBST 1x com 2% de soro de leite), para subsequente 3 lavagens com TBST 1X a cada 5 minutos sobre agitação vertical. Após lavagem, as membranas foram submetidas ao anticorpo primário de SIRT1 (D1D7, Cell Signaling Technology®, Massachusetts, EUA) na diluição de 1:1000 e, β-Actin (13E5 Cell

Signaling Technology[®], Massachusetts, EUA) na diluição de 1:5000. Ambos os anticorpos foram diluídos em uma solução de TBST 1X a 2 % de BSA. Após incubação a 4°C *overnight*, as membranas foram lavadas três vezes novamente e submetidas aos anticorpos secundários respectivos aos primários, durante 1h em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram anti-*rabbit* (SAB3700861-2MG) e anti-*mouse* (A9044-2ML) na diluição de 1:10000 em TBS-T 1X (0,1% de Tween-20) (Sigma-Aldrich[®], Missouri, EUA). Novamente, após 3 lavagens, as membranas foram reveladas com *SuperSignal Chemiluminescent Substrate*[®] (Thermo Fisher Scientific[™], Massachusetts, EUA) e com o equipamento LAS-500 (GE Healthcare, Chicago, EUA). A quantificação foi feita baseada nos *pixels* das bandas, as quais foram mensuradas pelo software ImageJ[®].

3.20 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SIRT1

A atividade de SIRT1 foi determinada com um kit fluorimétrico SIRT1 (Enzo[®] Life Sciences[™], Nova Iorque) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, este ensaio usa um pequeno peptídeo acetilado com lisina, correspondente a K₃₈₂ de p53 humano. O resíduo de lisina é desacetilado por SIRT1, e este processo é dependente da adição de NAD⁺ exógeno. Essa NAD⁺ exógeno foi necessária, provavelmente porque o NAD⁺ endógeno foi perdido durante a preparação da amostra. Os inibidores de SIRT1, a nicotinamida (2 mM), suramina (100 μM) e sirtinol (100 μM) foram usados para confirmar a especificidade da reação. As amostras foram homogeneizadas em tampão NETN disponibilizado pelo kit. Os homogenatos foram então incubados durante 10 minutos a 37 ° C para

permitir a degradação de qualquer contaminante de NAD⁺. A seguir, foi adicionado DTT 10 mM ao meio e os homogenatos foram incubados novamente durante 10 minutos a 37 ° C. Os homogenatos de 25 µg de proteína/poço, foram então incubados em tampão de ensaio SIRT1 na presença de substrato *Fluor de Lys – SIRT1* a 100 µM (Enzo® Life Sciences™) e 5 µM de TSA® para determinar a atividade independente de SIRT1 (controle) ou com o mesmo substrato. Cerca de 5 µM TSA e 200 µM de NAD⁺, forma utilizados para determinar a atividade dependente de SIRT1. Após 1 hora de incubação a 37 ° C, a reação foi terminada pela adição de uma solução contendo *Fluor de Lys Developer* (Enzo® Life Sciences™) e 2 mM de nicotinamida. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora. Os valores foram determinados em um leitor de placa fluorométrica (Synergy HTX® da Biotek) com um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm. O cálculo da fluorescência incluiu a subtração de um branco consistindo em tampão sem NAD⁺, o qual foi expresso como uma porcentagem em relação ao controle (linha pontilhada no gráfico). Em todos os casos, confirmamos a linearidade da reação ao longo do tempo.

3.21 DIGESTÃO DE TECIDOS: BAÇO, LINFONODOS E TECIDO ADIPOSEO

3.21.1 Processamento de baço e linfonodos

Inicialmente os baços e os linfonodos (inguinais, braquiais e axilares) foram excisados dos animais e mantidos dentro de meio RPMI 1640 completo (1% de penicilina, streptomina, piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais, 25mM de HEPES e uma diluição do 1:1000 de 2-β-Mercaptoetano da Gibco® (Massachusetts, USA) em gelo picado (4°C). Posteriormente os órgãos foram macerados utilizando o

êmbolo de seringas de 1 mL (BD™, Califórnia, EUA) em *cell-strainers* de 70 µM/Nylon apoiado sob um tubo Falcon® (Nova Iorque, EUA) de 50 mL. Após os baços passarem pela lise hemácias via tampão de lise ACK (Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA), os órgãos macerados passaram por centrifugação de 1500 rpm à 4°C por 5 minutos. Posteriormente, as células viáveis foram contadas através de câmara de Neubauer, utilizando o corante de viabilidade *Trypan Blue*. Após padronizar igualmente a quantidade células para cada amostra, as células foram plaqueadas para os experimentos subsequentes.

3.21.2 Processamento do tecido adiposo branco (WAT)

Os tecidos adiposos subcutâneos inguinais (SAT) e perigonadal visceral (VAT) foram excisados dos animais e mantidos dentro de meio DMEN *low glucose* completo, ou seja, contendo 1% de BSA *low fatty-acids* (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), 1% de penicilina, streptomina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 75 mM de HEPES e 1:1000 de 2-β-Mercaptoetanol (Gibco®, Massachusetts, USA), mantidos em gelo picado (4°C). Posteriormente, os órgãos foram vigorosamente picotados, os quais estavam acomodados em placas de 6 poços. Na próxima etapa, os tecidos foram mantidos em uma incubadora sob agitação de 180 rpm, por 30 minutos e contendo 3 mL de DMEN *low glucose* completo com 0.5 mg/mL de colagenase IV (solução de digestão). A solução de digestão foi neutralizada pela adição de 3 mL DMEN *low glucose* completo, seguido da maceração dos tecidos sobre *cell-strainers* de 100 µM/Nylon apoiado em um tubo Falcon® (Nova Iorque, EUA) de 50 ml. Após centrifugação de 1500 rpm a 4°C por 5 minutos, a gordura remanescente e o sobrenadante foram retirados por sucção a vácuo. O botão de células foi transferido para o outro tubo

Falcon® de 50 mL contendo 1 mL de RPMI completo. Posteriormente, as células viáveis coradas com *Trypan Blue* foram contadas através de câmara de Neubauer. Após padronizar igualmente a quantidade células para cada amostra, as células foram plaqueadas para seguintes experimentos.

3.22 MICROSCOPIA CONFOCAL

As BMDCs previamente isoladas por coluna (como foi feito no ensaio de proliferação), foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo *Round Glasses Coverslips*® (VWR International LLC™, Pensilvânia, EUA). Após aderência, as células foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. O PFA foi aspirado e duas lavagens (de 5 minutos cada) foram feitas com PBS 1X gelado. Em seguida, as amostras foram permeabilizadas com uma solução constituída de PBS 1X, 0.2% de triton x-100 e 1% de BSA por 2h à 4°C. Novamente, depois de aspirar a solução de permeabilização, as *coverslips* foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário de SIRT1 (D1D7, Cell Signaling Technology®, Massachusetts, EUA) na diluição de 1:500 em solução de permeabilização. Na manhã seguinte, as *coverslips* foram lavadas 3x com PBS 1x gelado, para subsequente incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit* PE (concentração e clone Abcam®, Cambridge, Reino Unido) durante 1h a 37°C na ausência de luz. Após novas 3 lavagens com PBS 1X gelado, as *coverslips* foram incubadas com 10 µg/mL com Hoechst® (H3570, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA) e *Phalloidin Dylight* AF488 (21833, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA). Após a última lavagem com PBS 1X gelado, as lâminas foram montadas com o meio de montagem CS7703/DAKO

(Agilent, Massachusetts, EUA). As imagens foram adquiridas pelo Multiphoton confocal, Zeiss LSM-780 NLO (Zeiss™, Oberkochen, Alemanha) e analisadas pelo ImageJ®.

3.23 ANÁLISE DE BIOINFOMÁTICA DE BANCO DE DADOS

Através dos dados de transcriptoma disponibilizados pela publicação do GSE42432, publicado na plataforma GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), as amostras foram separadas em dois grupos, como feito previamente (KONINGS et al., 2014): 9 pacientes tratados com placebo (Mock) e 9 pacientes tratados com RES. Posteriormente foi verificado a normalização dos dados pela própria plataforma do GEO2R, que por sua vez gerou a lista dos genes alterados avaliados por RNAseq em Log na base 2, identificados também como *mRNA intensity*. Os valores de IDO1 foram extraídos do banco de dados, plotados e avaliados pela análise do teste *t-student*, utilizando o software *GraphPad Prism 8*®. Além disso, esses mesmos genes considerados diferentemente expressos entre os grupos analisados, foram submetidos à uma análise de enriquecimento pelo algoritmo do *website* Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>), que por sua vez, gerou as vias metabólicas (via KEGG *pathway analysis*) e de sinalização celular (via GO *biological analysis*) na ordem de $-\text{Log}_{10}(\text{P})$.

3.24 CALORIMETRIA

Os camundongos foram normalizados quanto à composição corporal e aclimatados por 24h antes do gasto energético de 24 horas (EE) a ser medido, o qual foi obtido usando um sistema Oxymax FAST de 8 câmaras (Columbus Instruments, Washignton, EUA) para a análise de consumo de oxigênio (VO₂), produção de dióxido de carbono (VCO₂) e a taxa de troca respiratória (RER). Os animais tinham a mesma quantidade ração (50g), independentemente do tipo (hiperlipídica ou padrão) e água a vontade.

3.25 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise por teste *t-student*, ANOVA ou AUC (*Area Under the Curve*), quando apropriado. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão para variáveis paramétricas e não-paramétricas submetidas previamente ao teste de normalidade. Todas as análises foram calculadas utilizando o software *GraphPad Prism 6[®]/8[®]* e as diferenças serão consideradas significantes quando o valor do *p* ajustado for menor ou igual a 0,05.

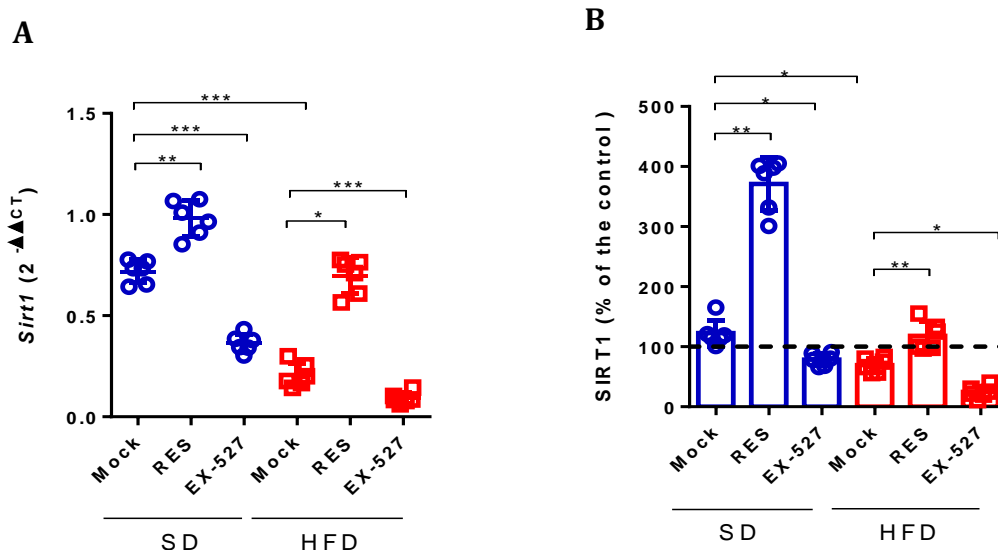
4. RESULTADOS

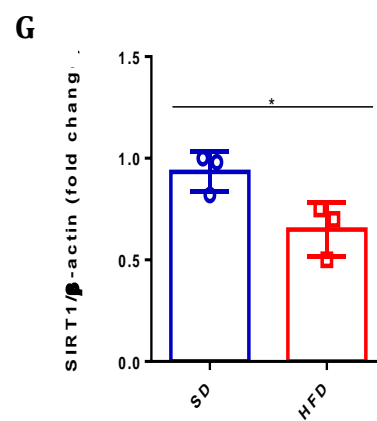
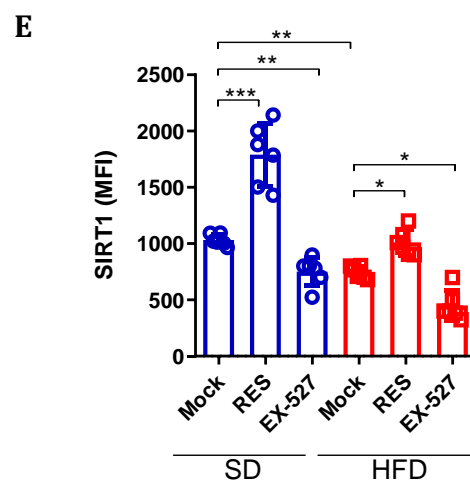
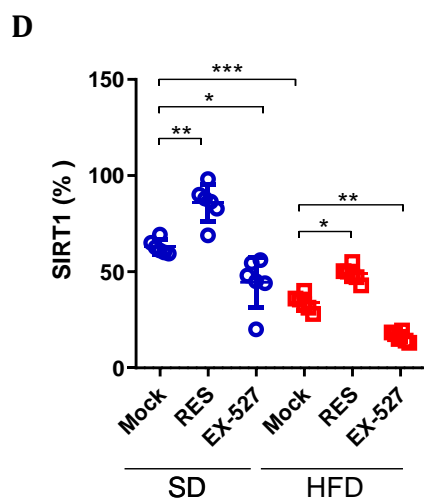
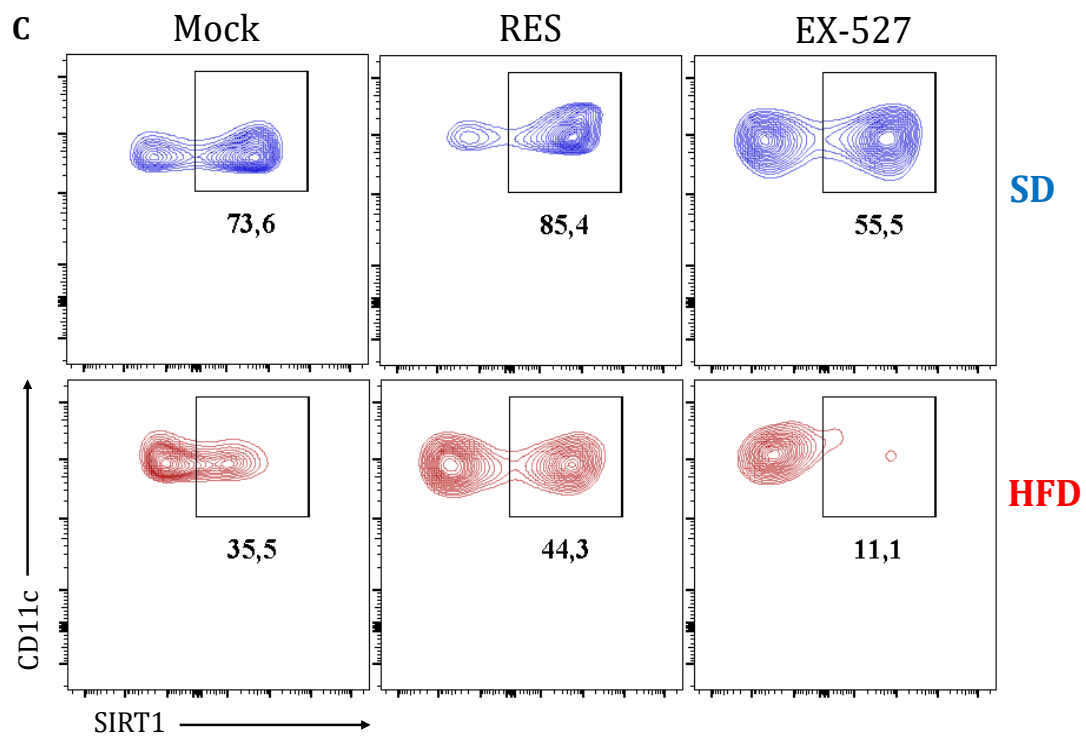
4.1 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ATIVIDADE DE SIRT1 EM BMDCS DE ANIMAIS MAGROS E OBESOS

O composto fenólico resveratrol (RES) aumenta as funções efectoras de SIRT1 através da interação com o peptídeo *SF38-K23*, o qual está presente na estrutura dessa HDAC (HOWITZ et al., 2003; VISWANATHAN et al., 2005). Além disso, RES pode aumentar a expressão de SIRT1 por estimular a sua própria desacetilação (CHAO et al., 2017; MORITA et al., 2012). Por outro lado, o composto *6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Carbazole-1-carboxamide*, também conhecido como EX-527, é um inibidor seletivo para SIRT1, o qual não tem o potencial de inibir HDACS das classes I e II em concentração até 100 μM (DAENTHANASANMAK et al., 2019; GERTZ et al., 2013; NIKSERESHT; KHODAGHOLI; AHMADIANI, 2019). Já foram encontradas evidências que o EX-527 ocupa o sítio de NAD⁺ e o sítio alostérico chamado *pocket* de SIRT1, que são comprovadamente essenciais para o seu funcionamento. Também foram demonstradas evidências de que o EX-527 tem potencial de reduzir a expressão de *Sirt1* (CHAO et al., 2017; MORITA et al., 2012).

Sabendo o efeito dessas duas drogas (de RES e EX-527) sob SIRT1, diferenciamos DCs da medula óssea (BMDCs) de animais em dieta padrão (BMDCs/SD) e dieta hiper lipídica (BMDCs/HFD) para avaliarmos a expressão gênica, proteica e atividade de SIRT1, tanto no estado basal quanto após o tratamento de RES e EX-527.

Depois de ensaios avaliando a dose resposta de RES e EX-527 relacionados a modulação da expressão de SIRT1 (**Anexo 1A e 1B**), observamos que a expressão *Sirt1* em BMDCs/SD estava aumentada quando comparado a BMDCs/HFD. Além disso, observamos que a adição de RES (100 μ M) aumentou a expressão de *Sirt1* em ambas BMDCs, porém de maneira mais efetiva em BMDCs/SD. Em contrapartida, EX-527 (20 μ M) diminuiu a expressão dessa HDAC3 principalmente em BMDCs/HFD (**Figura 2A**). A atividade de SIRT1 também seguiu o mesmo perfil observado em relação a expressão gênica (**Figura 2B**). De maneira complementar, verificamos tanto por citometria (**Figura 2C-2E**) quanto por *western blot* (**Figura 2F e 2G**) que BMDCs/SD possuem menor quantidade de SIRT1 em relação as BMDCs/HFD, sendo que o tratamento com RES teve maior efeito em BMDCs/SD, e o EX-527 (20 μ M) agiu mais efetivamente em BMDCs/HFD. Por fim, visualizamos por microscopia confocal a presença majoritariamente no núcleo de SIRT1 em BMDCs/SD quando comparado com BMDCs/HFD (**Figura 2H**). Portanto, os níveis de expressão gênica, proteico e de atividade SIRT1 estão afetados diferentemente por RES e EX-527 em BMDCs/SD e HFD.





H

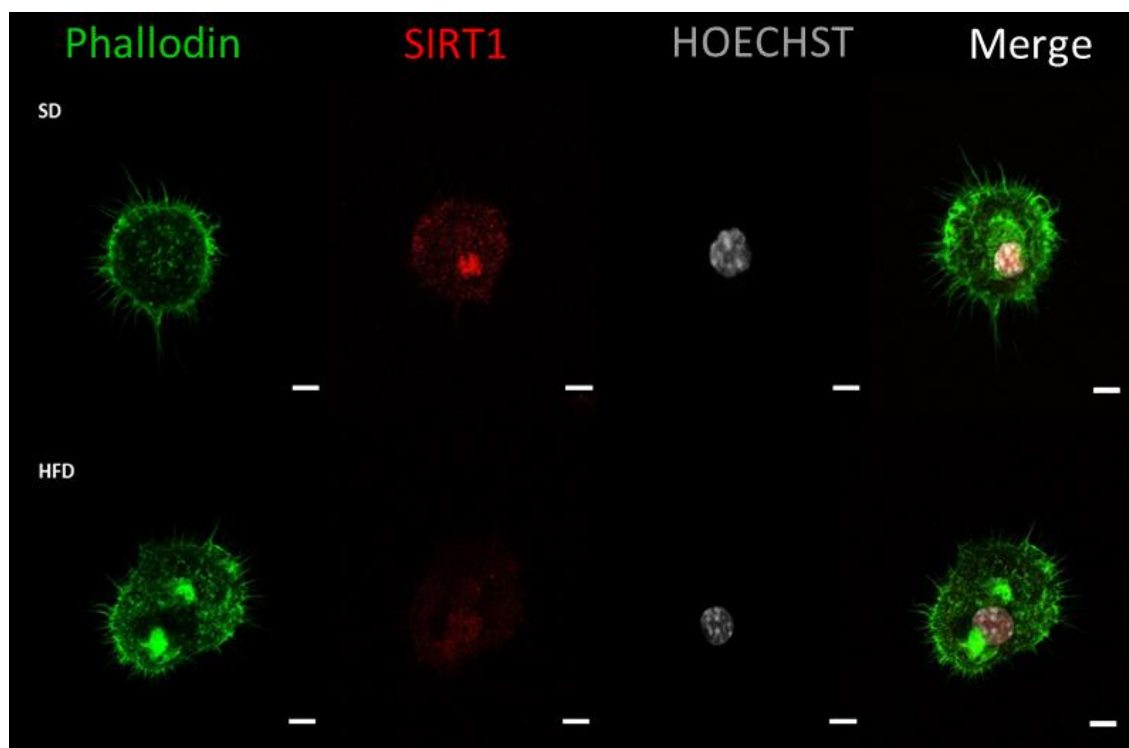


Figura 2 - SIRT1 em BMDCs/SD e HFD, tem expressão gênica, proteica e atividade diferentes.

PCR quantitativo da expressão de *Sirt1* de BMDCs/SD e HFD, com ou sem RES (100 μ M/24h) e EX-527 (20 μ M/24h) (**Painel 2A**). Ensaio fluorimétrico de atividade SIRT1 (FLUOR DE LYS® *SIRT1* fluorometric drug discovery assay kit, Enzo, BML-AK555-0001) do extrato proteico total de BMDCs/SD e HFD, previamente tratadas com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) ou sem tratamento (**Painel 2B**). Dot plot demonstrando a porcentagem (**Painéis 2C e 2D**) e MFI (**Painel 2E**) de SIRT1 em BMDCs/SD e HFD (*gated on: Live&Dead-CD11c+IA/IE+CD135+*), tratadas ou não com RES [100 μ M/24h] ou EX-527 [20 μ M/24h]. Detecção dos níveis proteicos por *Western Blot* (**Painéis 2F e 2G**) e microscopia confocal (**Painel 2H**) da proteína SIRT1 (em vermelho) em BMDCs/SD e HFD. Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.2 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SIRT1 AFETA O FENÓTIPO DE BMDC/SD E

HFD

Para que as DCs possam desempenhar sua função de APC são necessários três sinais durante uma sinapse imunológica: complexos peptídico antigênico-MHC, coestimuladores e fatores solúveis que essa célula secreta no microambiente. Esses

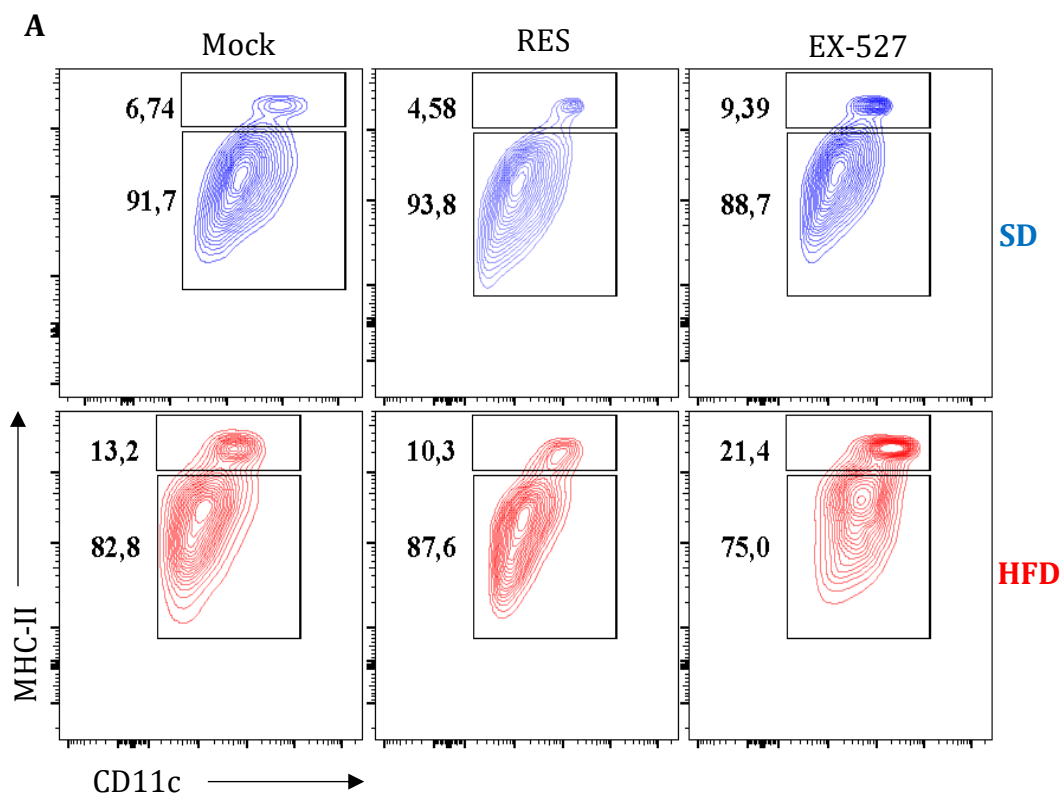
sinais determinam a intensidade e tipo da resposta imune (EISENBARTH, 2019; SCHLITZER; GINHOUX, 2014).

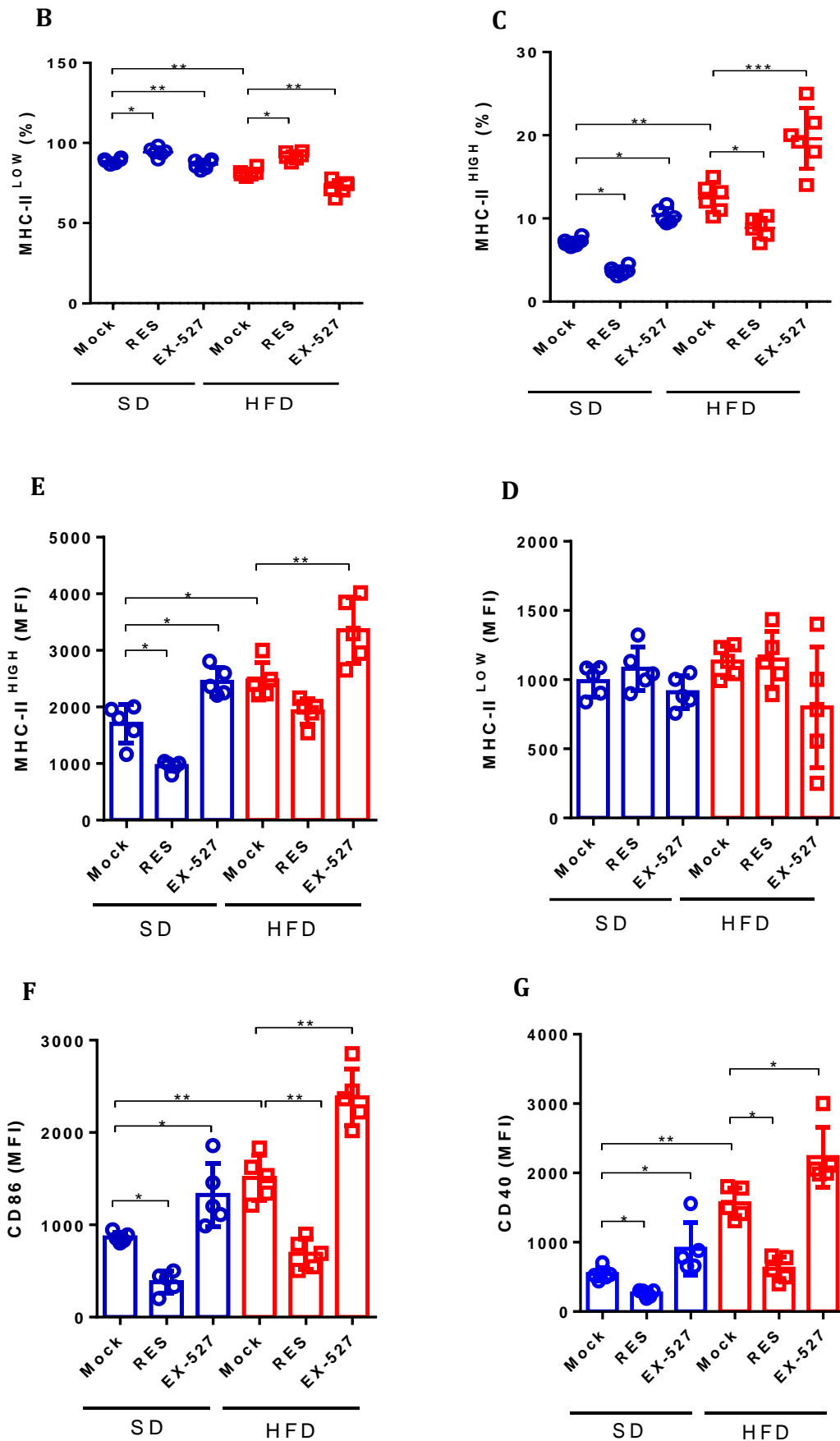
A alterações metabólicas em DCs alteram suas funções de APC (DAENTHANASANMAK et al., 2019; MONDANELLI et al., 2017; PATENTE; PELGROM; EVERTS, 2019), incluindo modulações da presença e na atividades de HDACs (LIU et al., 2015a; SONG et al., 2011; ZLOTNIKOV-KLIONSKY et al., 2015).

Observamos inicialmente que BMDCs/SD possuem diferenças entre as populações MHC-II^{HIGH} e MHC-II^{LOW} quando comparado a BMDCs/HFD. Além disso, o tratamento com RES diminui a população de MHC-II^{HIGH} e aumenta a população MHC-II^{LOW} principalmente e BMDCs/SD, e o oposto acontece com EX-527 (**Figura 3A-3C**). Além da porcentagem, o MFI de MHC-II está mais elevado nas BMDCs/SD do que nas BMDCs/HFD, sendo que o tratamento com RES diminuiu ao passo que EX-527 aumentou o MFI de MHC-II em ambas BMDCs (**Figura 3D e 3E**). Ainda, o MFI tanto de CD86 quanto de CD40 estiveram mais elevados em BMDCs/HFD, os quais foram reduzidos principalmente após o tratamento com RES em BMDCs/SD e aumentados principalmente em BMDCs/HFD após a administração de EX-527 (**Figura 3F e 3G**).

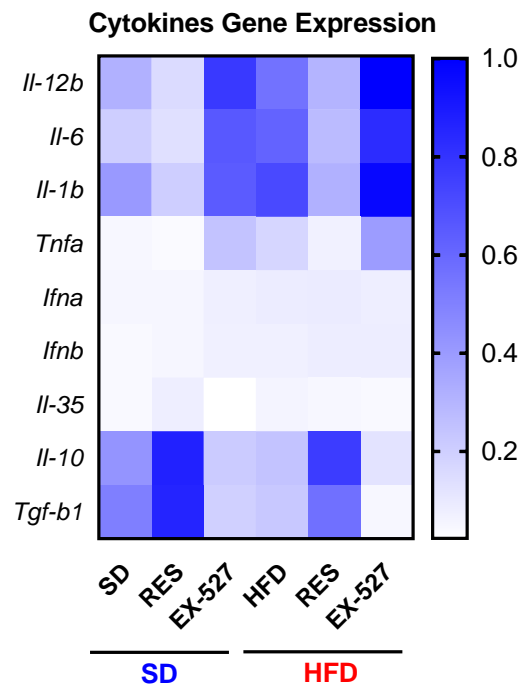
Quantificamos a expressão gênica de citocinas produzidas por DCs que tem o potencial de modular o fenótipo das demais células do sistema imune, principalmente células T (PATENTE; PELGROM; EVERTS, 2019). BMDCs/SD possuem um perfil diferente de expressão gênica de citocinas em relação a BMDCs/HFD, as quais possuem uma alta expressão de *Il-2b*, *Il-6* e *pro-Il-1b*. Em contrapartida, BMDCs/SD possuem uma expressão mais elevada de *Il-10* e *Tgf- β 1*,

comparado às BMDCs/HFD (**Figura 3I**). O tratamento com RES promoveu um aumento de *Il-10* e *Tgf-b1* e uma diminuição de *Il-12b*, *Il-6* e *Il-1b* em ambas as BMDCs, porém com maior efeito sob BMDCs/SD. Por outro lado, o tratamento com EX-527 promoveu uma diminuição de *Il-10* e *Tgf-b1* e um aumento de *Il-2b*, *Il-6* e *Il-1b*, principalmente em BMDCs/HFD (**Figura 3F**). Observamos que a produção das citocinas testadas anteriormente por qPCR em BMDCs/SD e BMDCs/HFD seguiram o mesmo padrão dos dados obtidos para expressão gênica, isto é, o tratamento com RES promoveu aumento de IL-10 e TGF- β 1 e diminuição de IL-12p40, IL-6 e IL-1 β . Já o tratamento com EX-527, promoveu uma diminuição de IL-10 e TGF- β 1 e aumento de IL-12p40, IL-6 e IL-1 β (**Figura 3L-3M**).

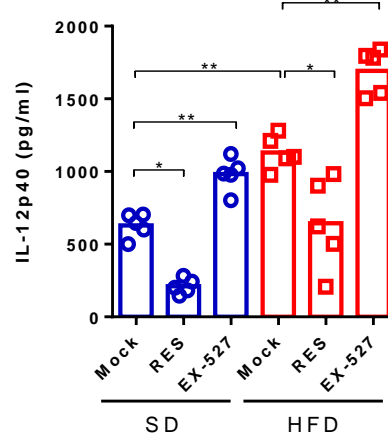




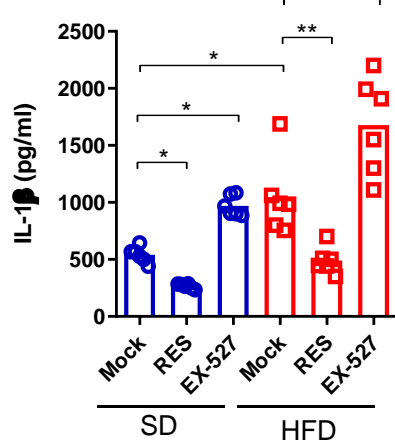
H



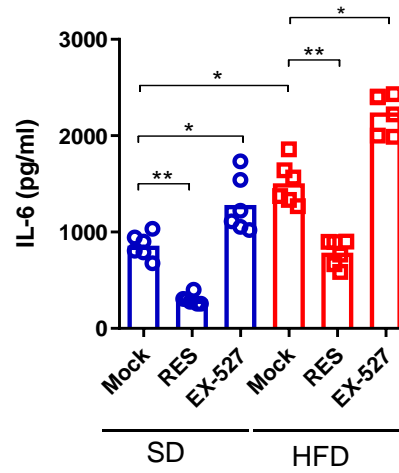
I



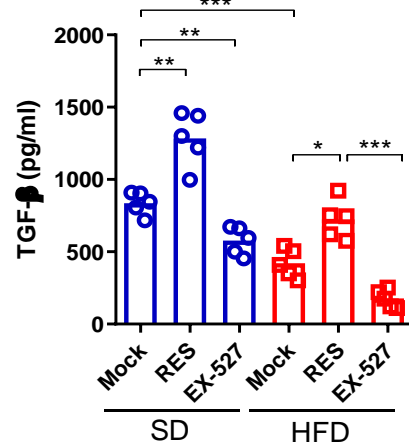
J



K



L



M

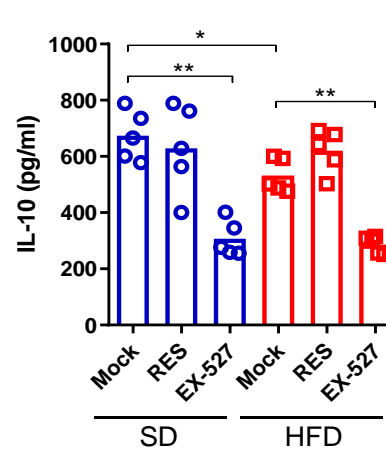


Figura 3 - Alterações em SIRT1 promovem modificações em componentes essenciais para apresentação antigênica de BMDCs/SD e HFD.

Counter plot (*gated on: Live&Dead-CD11c+CD135+*) da porcentagem (**Painéis 3A-3C**) e MFI (**Painéis 3D e 3E**) de MHC-II^{HIGH} e MHC-II^{LOW} (IA/IE) de BMDCs/SD e HFD, na presença ou ausência de RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h). MFI dos costimuladores CD86 (**Painel 3F**) e CD40 (**Painel 3G**) de BMDCs/SD e HFD, na presença ou ausência de RES [100 μ M/24h] ou EX-527 [20 μ M/24h]. *Heatmap* representando a quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$ /fold change relativo ao mRNA na de *B-actina*) do qPCR array de *Il-12b*, *Il-6*, *pro-Il-1b*, *Tnfa*, *Ifna*, *Ifnb*, *Il-35*, *Il-10* e *Tgf-b1* (**Painel 3H**) de BMDCs/SD e HFD, com ou sem RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h). Teste de ELISA de IL-12p40 (**Painel 3I**), IL-6 (**Painel 3J**), IL-1 β (**Painel 3K**), TGF- β (**Painel 3L**) e IL-10 (**Figura 3M**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001; ****= p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8[®]. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.3 IMPACTO DA MODULAÇÃO DE EXPRESSÃO SIRT1 NA FUNÇÃO DAS BMDC/SD E HFD NA ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4+

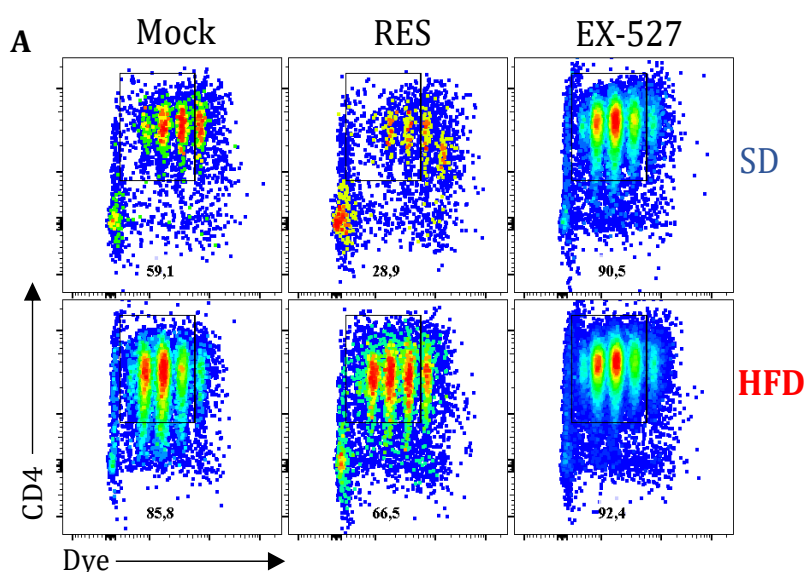
Como mencionado anteriormente, as DCs se destacam das demais APCs por promover de maneira mais eficaz a polarização de células T *náive* (EISENBARTH, 2019; HARPER et al., 2015). Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que SIRT1 tem o potencial de modular células T e suas funções efetoras (KATSUYAMA et al., 2020; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2012). Porém, poucos estudos demonstraram se células mieloides (DONG et al., 2020) ou DCs (LIU et al., 2015a) modulam diretamente ativação e polarização de células T, ainda mais DCs em diferentes microambientes, como no caso de dietas diferentes.

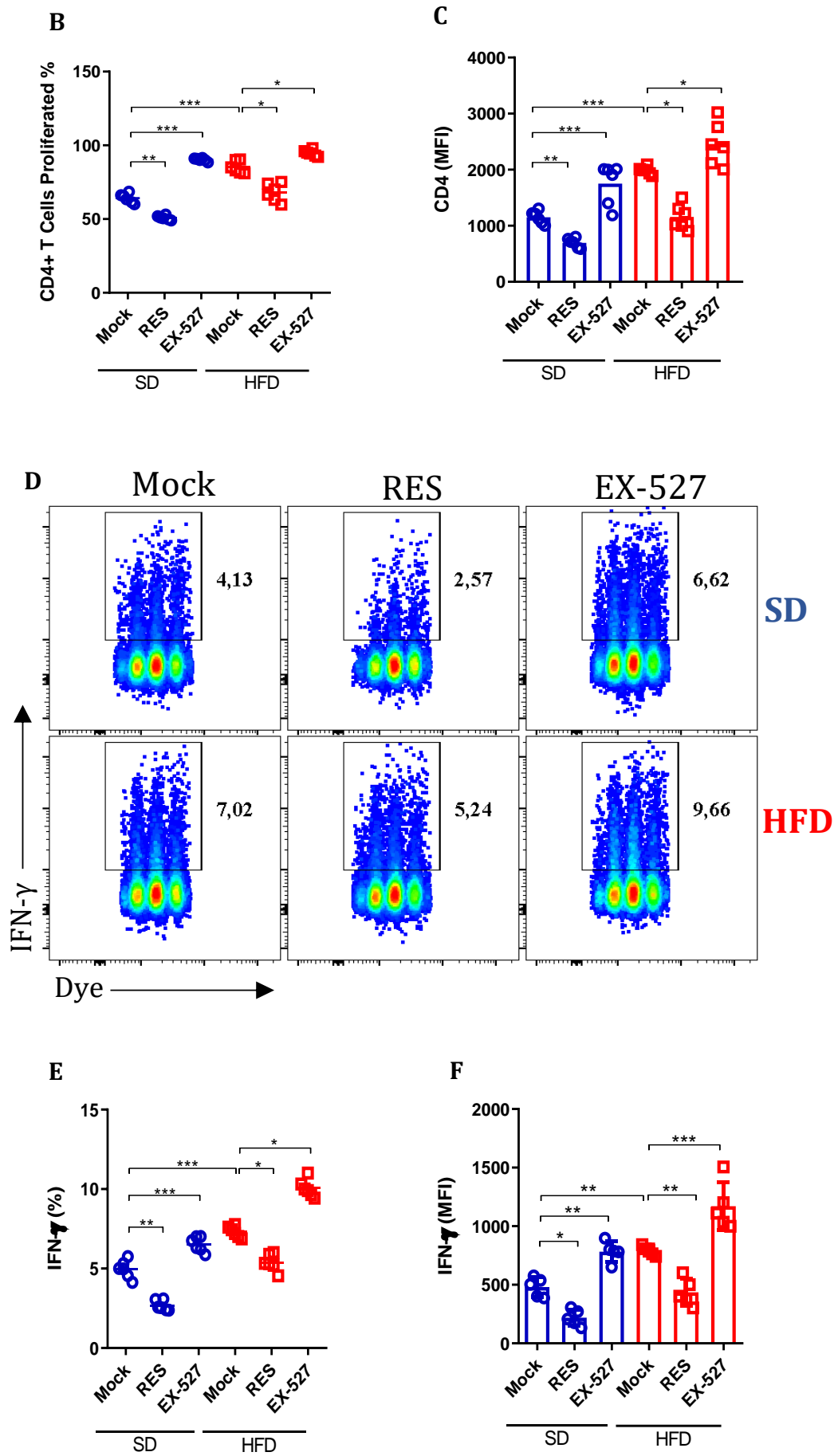
Inicialmente, avaliamos se BMDCs/SD e HFD, pulsadas com OVA e em cocultivo com células T CD4+ *náive* isoladas de animais OT-II, previamente marcadas com o marcador de proliferação celular CellTrace[™] Violet (Invitrogen), influenciam proliferação, polarização e ativação dessas células T. As BMDCs/SD induziram uma menor porcentagem de proliferação de células TCD4+ do que BMDCs/HFD. Em

acrécimo, SIRT1 parece desempenhar papel importante neste contexto, pois o tratamento com RES reduziu enquanto que o tratamento com EX-527 aumentou a proliferação dessas células (**Figura 4A-4C**).

Nestes mesmos experimentos, sem nenhuma introdução de citocinas indutoras de polarização de linfócitos T, foi visto que BMDCs/HFD induzem maior expressão proteica de IFN- γ nas células T, a qual foi aumentada por EX-527 em ambas as BMDCs, porém mais evidentemente naquelas derivadas de animais HFD (**Figura 4D-4F**). Em contrapartida, BMDCs/SD induzem maior expressão proteica de Foxp3, a qual foi aumentada por RES somente em BMDCs derivadas de animais SD (**Figura 4G-4I**).

Em termos de ativação, verificamos que BMDCs/HFD induziram maior expressão proteica de CD44, além de reduzir CD62L em T CD4+, quando comparado as BMDCs/SD. RES induziu principalmente a diminuição do MFI de CD44, além do aumento de CD62L em T CD4+. EX-527 realizou a função oposta de RES, sob o MFI de CD44 e CD62L (**Figura 4I-4J**).





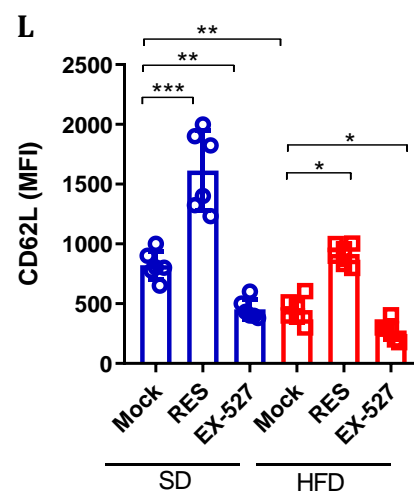
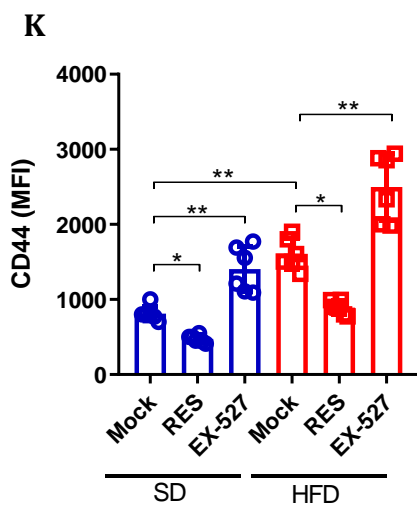
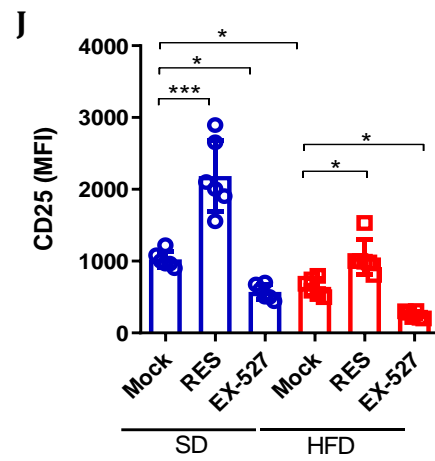
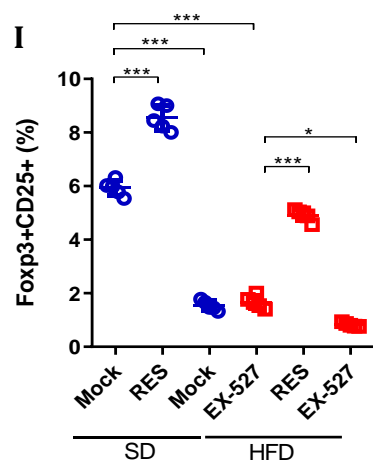
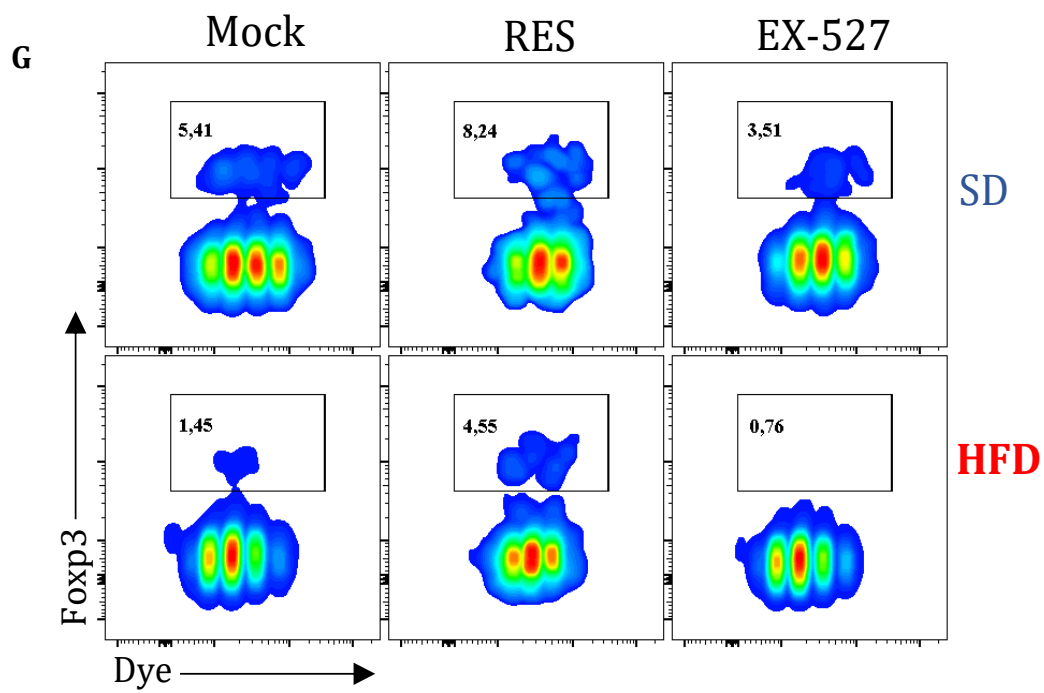


Figura 4 - Alterações diferenciadas em BMDCs/SD e HFD modificaram a proliferação e polarização de células T CD4+ antígeno-específicas in vitro.

BMDCs/SD e HFD pulsadas com OVA (0,1 mg/ml/24h) mais RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) e co-cultivadas com células T CD4+ *n ive* isoladas de animais OT-II (**Painéis 4A e 4B**). A porcentagem (**Painéis 4D e 4E**) e o MFI (**Painéis 4F e 4G**) (*gated on: Live&Dead-CD11c-CD4+CellTraceViolet+*) de c elas T CD4+ que produzem IFN- γ de acordo com o cultivo com BMDCs/SD e HFD, com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 [20 μ M/24h]. Porcentagem de c elas T CD4+Foxp3+ (**Painel 4H**) e MFI de CD25 (**Painel 4I**), CD44 (**Painel 4J**) e CD62L (**Painel 4K**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001; ****= p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8[®]. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repeti es experimentais.

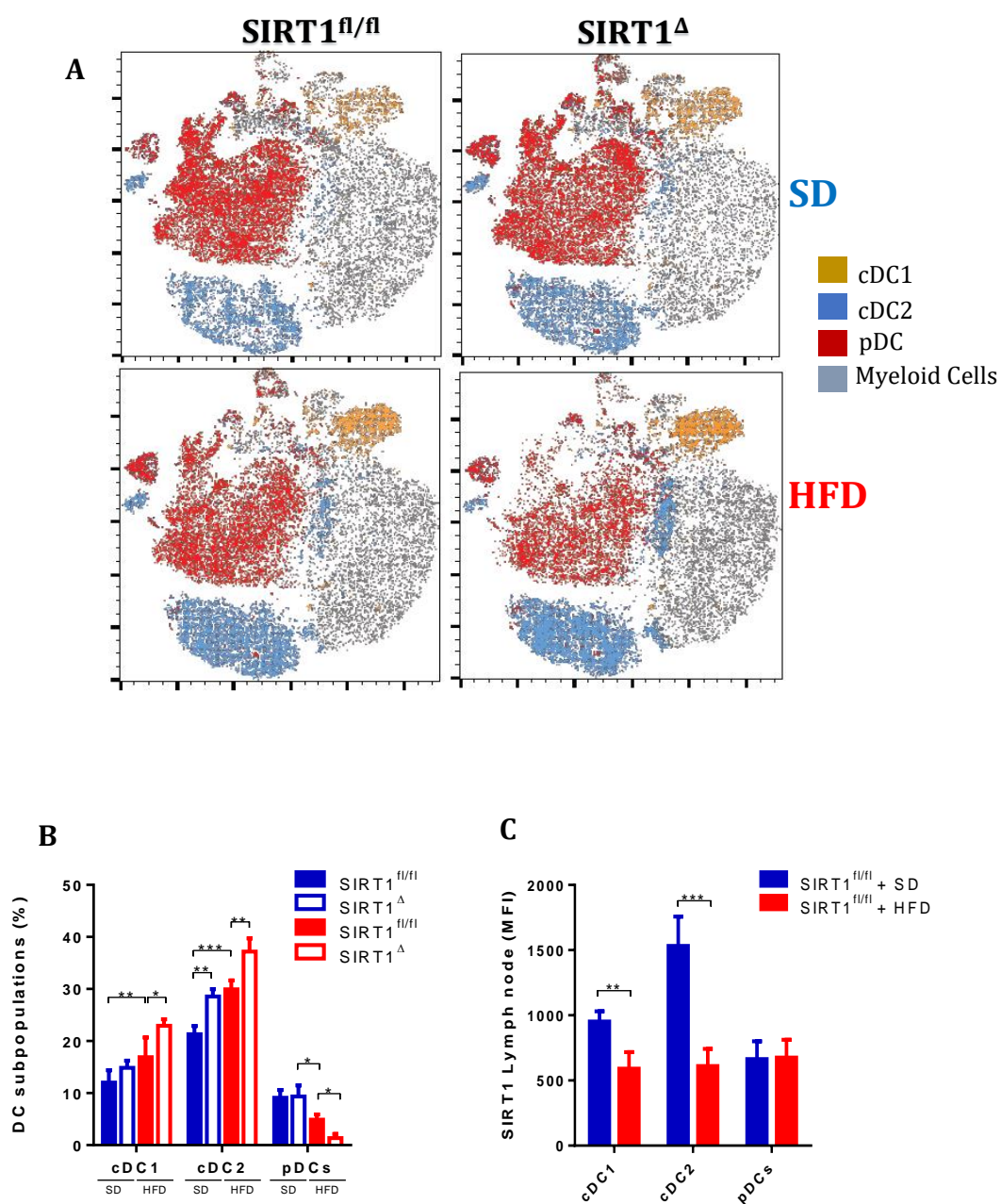
4.4 AUSÊNCIA DE SIRT1 ALTERAM AS SUBPOPULA ES DE DCs EM ÓRGÃOS LINFOIDES SECUNDÁRIOS DE ANIMAIS SOB DIETA HIPERLIPÍDICA

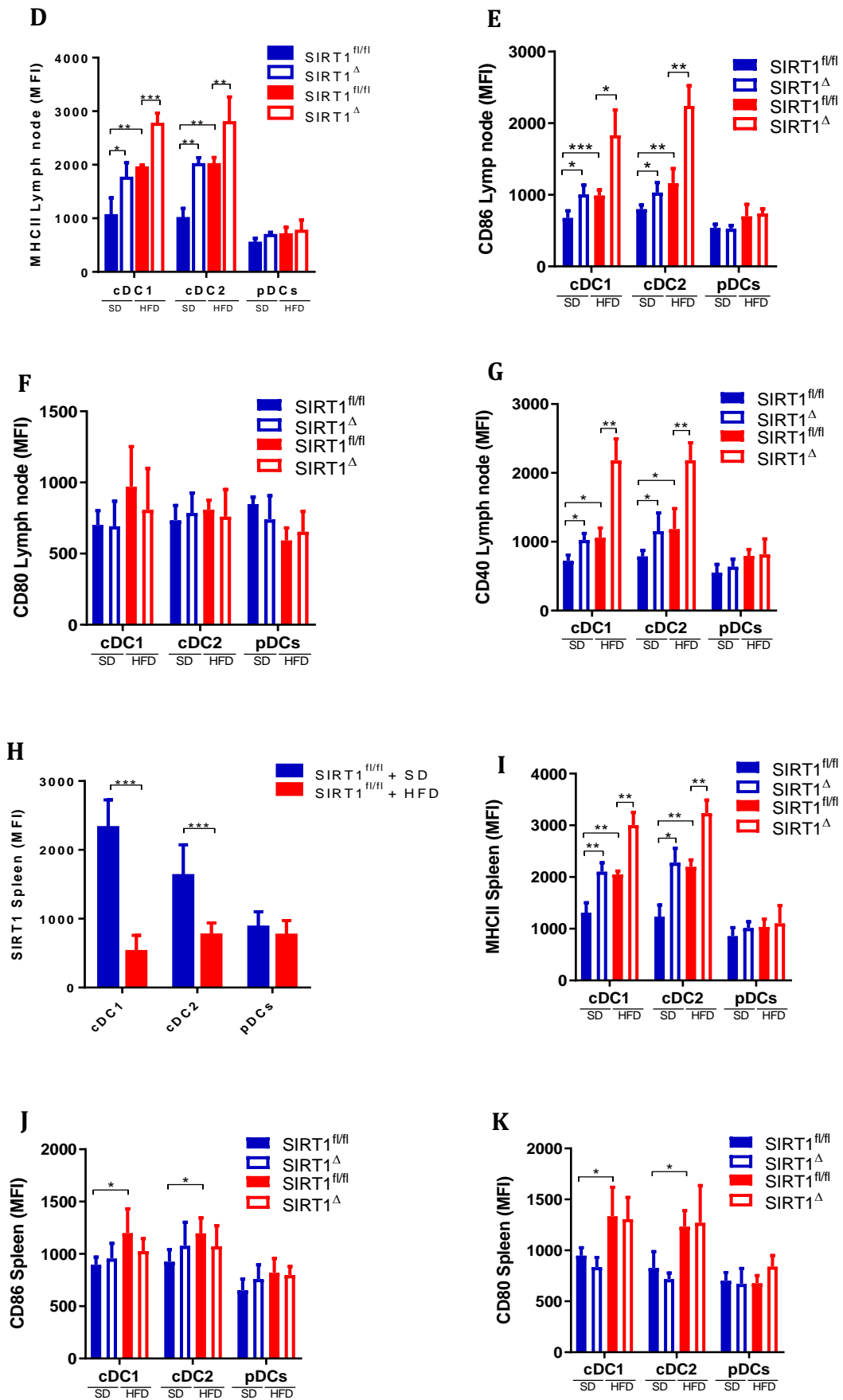
Para avaliarmos se a presença de SIRT1 pode alterar o perfil de DCs no microambiente em que essas c elas desempenham o papel de APC, geramos camundongos transg nicos pelo sistema *cre-lox*, com dele o de SIRT1 condicionada em DCs (CD11c+), os quais foram chamados de SIRT^Δ. Os controles usados foram camundongos contendo o gene *Sirt1* com as regiões *loxP*, porém sem o gene da enzima *Cre-recombinase* no promotor do gene *Itgax*. Esses camundongos foram representados pelo símbolo SIRT1^{fl/fl}.

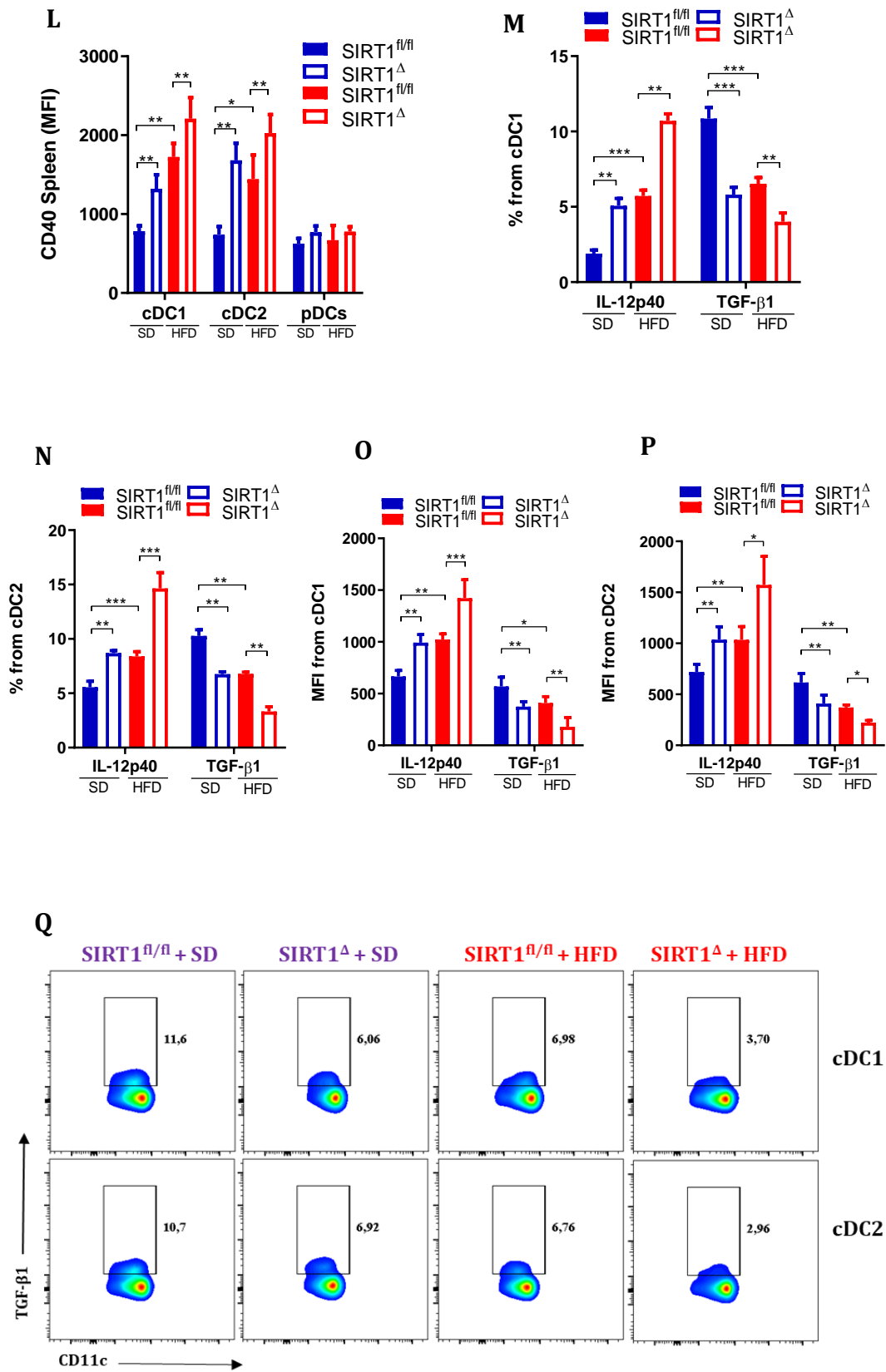
Após a gera o dos camundongos SIRT^Δ e SIRT1^{fl/fl}, nós os submetemos a uma dieta hiperlipídica durante 12 semanas, como realizado anteriormente para deriva o das BMDCs dos animais WT.

Verificamos um aumento da frequência de cDCs (cDC1 e cDC2) nos linfonodos de animais SIRT^Δ, quando comparado aos animais SIRT1^{fl/fl}. Além disso, observamos que a dieta hiperlipídica e a ausência de SIRT1 (animais SIRT^Δ) potencializa o aumento de cDCs e diminui a porcentagem de pDCs nos linfonodos

(Figura 5A e 5B). Adicionalmente, a dieta hiperlipídica reduziu SIRT1 em cDCs nos linfonodos e no baço (Figura 5C e 5H), as quais também sofreram alterações na expressão proteica de MHC-II (Figura 5D e 5H), coestimuladores, principalmente CD86 e CD40 (Figura 5E, 5G, 5J e 5L), além de alterações na produção de citocinas por cDCs, essencialmente IL12p40, IL-6 e TGF- β (Figura 5M-5R).







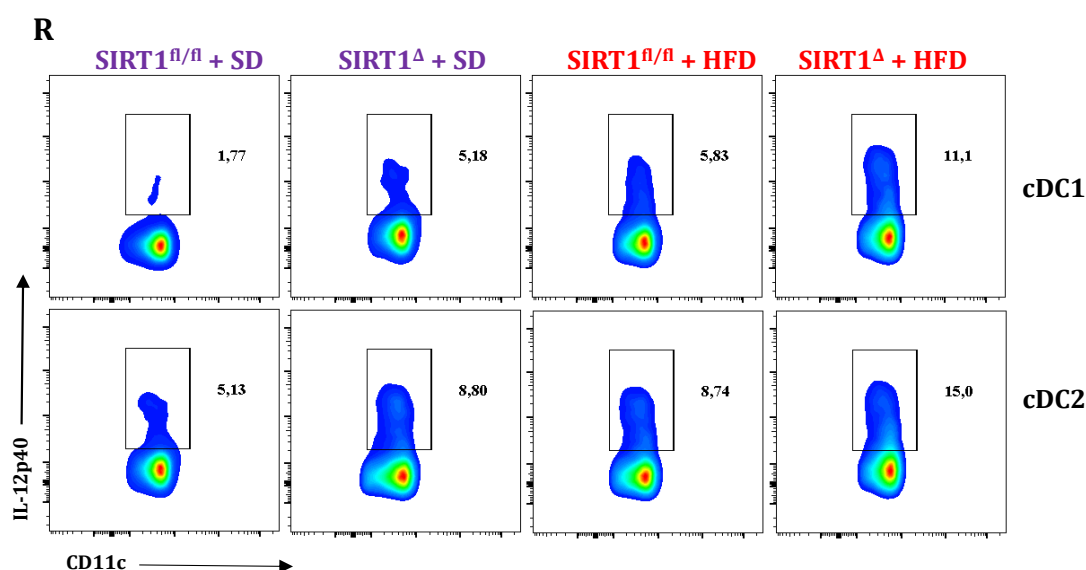


Figura 5 - Animais em HFD sem SIRT1 em DCs, possuem um desbalanço nas proporções de subpopulações de DCs nos linfonodos e alterações em hallmarks essenciais para apresentação antigênica.

Clustering (Agrupamento) pelo *plug-in* tse[®] do software FlowJo (BD[™]) (**Painel 5A**) de dados de citometria de fluxo (*gated on*: Live&Dead-F4/80-CD11c+IA/IE+CD11b+ouCD8α+), que demonstram a porcentagem de subpopulações de DCs em um *pool* dos linfonodos (inguinal, braquinal e axial) de animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Painel 5B**). MFI de SIRT1 em cDC1 e cDC2 dos linfonodos de animais SIRT1^{fl/fl} em SD e HFD (**Painel 5C**). MFI de MHC-II (**Painel 5D**), CD86 (**Painel 5E**) e CD40 (**Painel 5F**) nos linfonodos de animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Painel 5G**). MFI de SIRT1 em cDC1 e cDC2 do baço de animais SIRT1^{fl/fl} em SD e HFD (**Painel 5H**). MFI de MHC-II (**Painel 5I**), CD86 (**Painel 5J**) e CD40 (**Painel 5L**) no baço de SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD. Produção de IL-12p40 e TGF-β1 em ambas cDCs em linfonodos de animais de SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Painéis 5L-5R**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8[®]. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.5 ALTERAÇÃO NAS FUNÇÕES E NA DISTRIBUIÇÃO DE DCS DEFICIENTES DE SIRT1 NO TECIDO ADIPOSITO BRANCO AFETA A HOMEOSTASE DA GLICOSE.

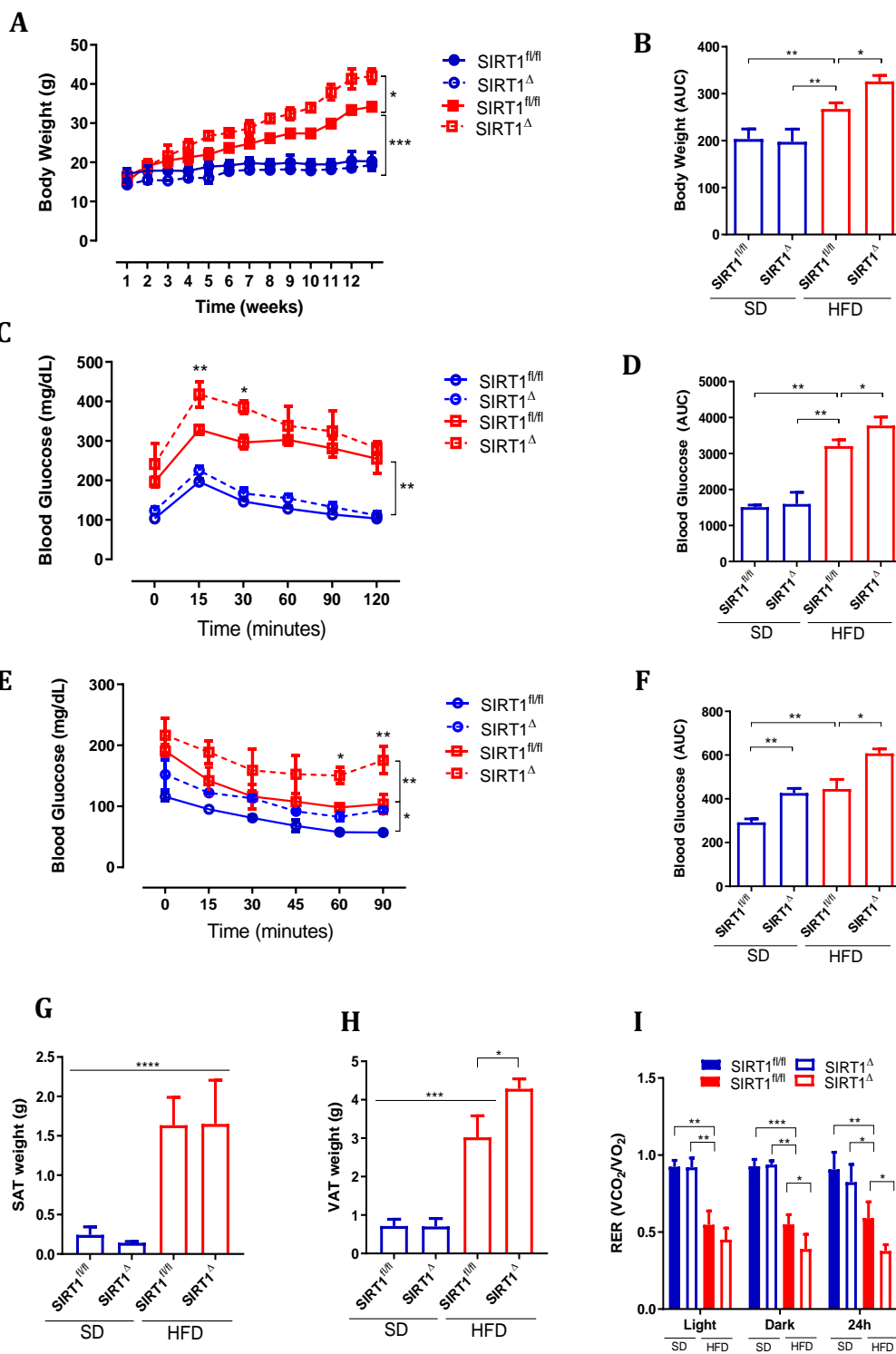
No final da dieta hiperlipídica, observamos que os animais SIRT1^Δ ganharam mais peso e tiveram maior massa corporal do que os animais SIRT1^{fl/fl}. Entretanto, não foi observado diferenças nesses dois parâmetros entre animais SIRT1^Δ e SIRT1^{fl/fl} em SD (**Figura 6A e 6B**). Esses mesmos animais SIRT1^Δ em HFD tiveram uma menor tolerância a glicose (**Figura 6C e 6D**), uma maior IR (**Figura 6E e 6F**) e maior quantidade de tecido adiposo visceral (**Figura 6G e 6H**). Além disso, o experimento

de calorimetria demonstrou que animais SIRT^Δ em HFD utilizavam majoritariamente o metabolismo de lipídeos para o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, estavam com menores índices de V_O₂ e VCO₂ (**Figura 6I-6K**).

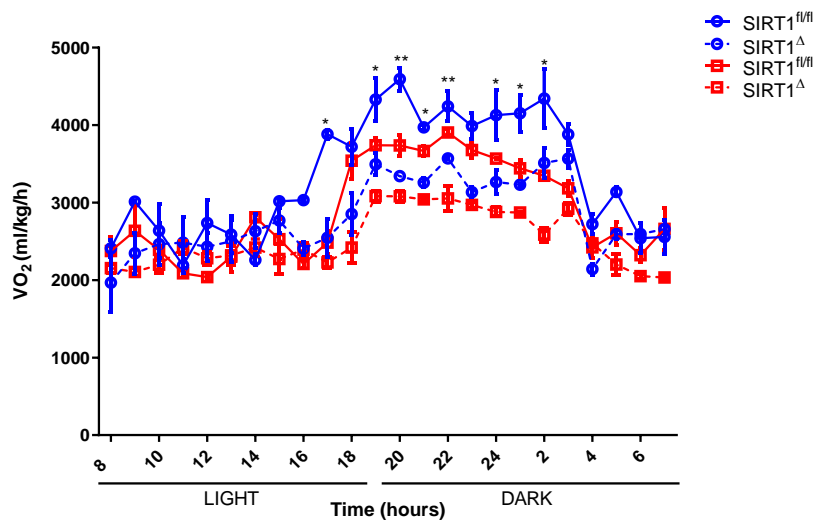
Devido a estudos recentes demonstrando que DCs presentes no tecido adiposo podem contribuir, independentemente de outras células, com a inflamação do tecido adiposo e com IR em indivíduos obesos (CHO et al., 2016b; ZLOTNIKOV-KLIONSKY et al., 2015), nós avaliamos a frequência dessas populações em diferentes compartimentos de tecido adiposo. Verificamos diferentes proporções de cDC1 (**Figura 6M**) e cDC2 (**Figura 6R**) no tecido adiposo visceral (**Figura 6L**) e subcutâneo (**Figura 6J-6L**) de animais SIRT^Δ e SIRT1^{fl/fl}. O VAT de animais SIRT1^{fl/fl} possui menores porcentagens de cDC1 e maiores de cDC2 do que o VAT de animais SIRT1^Δ, diferença a qual é ainda mais evidente, quando os animais são submetidos a HFD (**Figura 6G**). Essas mesmas cDCs de animais SIRT1^Δ em HFD, possuem MFI de MHC-II, CD86 e CD40 mais elevado quando comparado aos demais grupos (**Figura 6H-6J**).

Macdougall et al. demonstraram que a deleção dos genes β -catenina (*Cttnb1*) e *Ppar γ* , somente em cDCs, promovia o aumento nas respostas pró-inflamatórias no VAT após aplicação de uma dieta hiperlipídica, além de afetar a homeostase da glicose sistêmica (MACDOUGALL et al., 2018). Sabendo disso, avaliamos se animais SIRT1^Δ possuíam alterações em β -catenina e PPAR γ , o que poderia justificar o desbalanço na glicose sistêmica (**Figura 6C e 6D**).

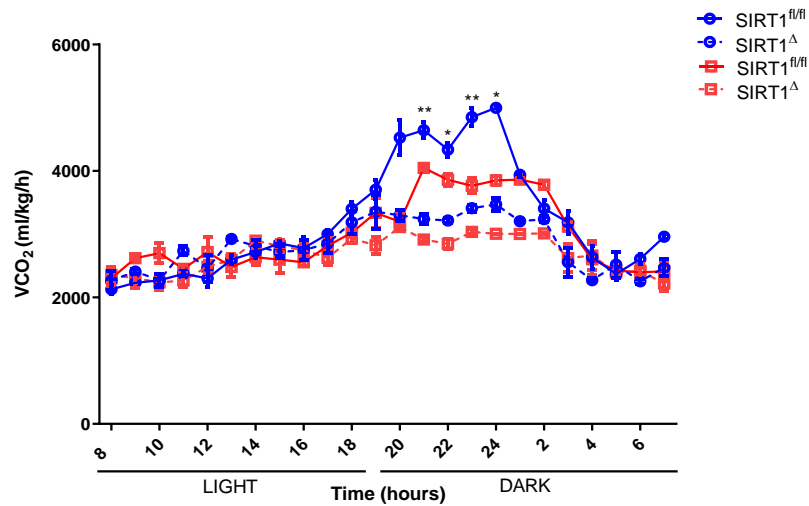
Por citometria de fluxo verificamos que, de fato, como observado anteriormente (MACDOUGALL et al., 2018), tanto PPAR γ em cDC2, quanto β -catenina em cDC1 estavam reduzidos no VAT de animais SIRT1^{fl/fl} obesos (**Figura 6J-6O**), porém, ainda mais em animais no VAT de SIRT1 Δ .



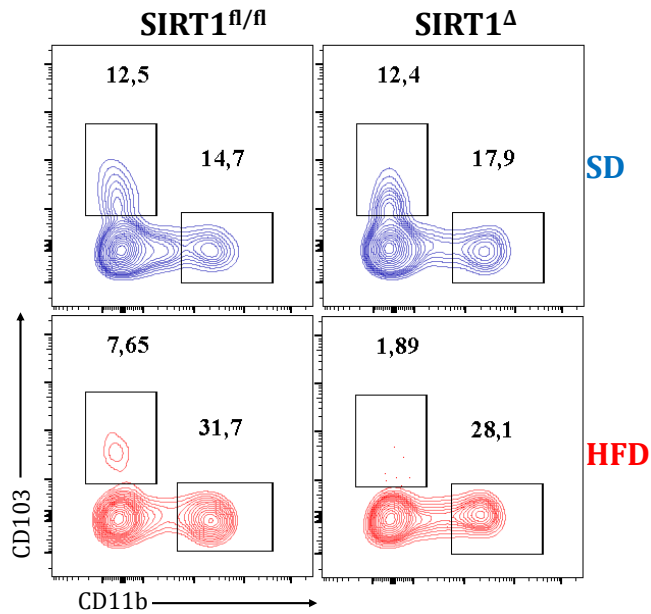
J



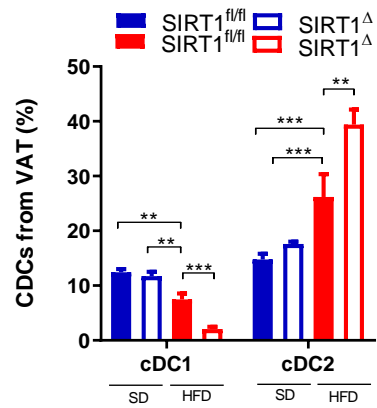
K

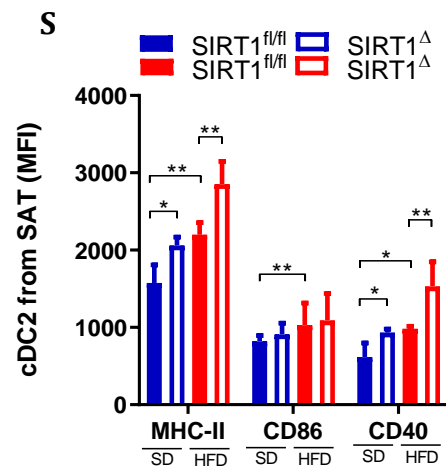
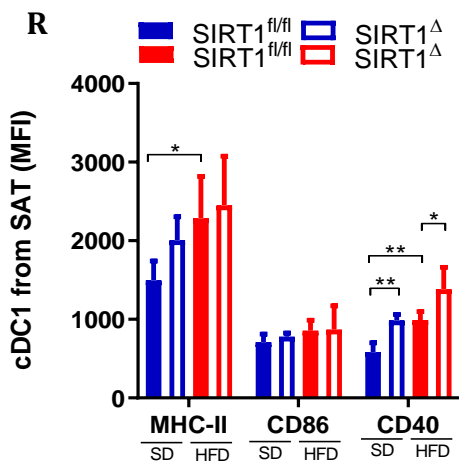
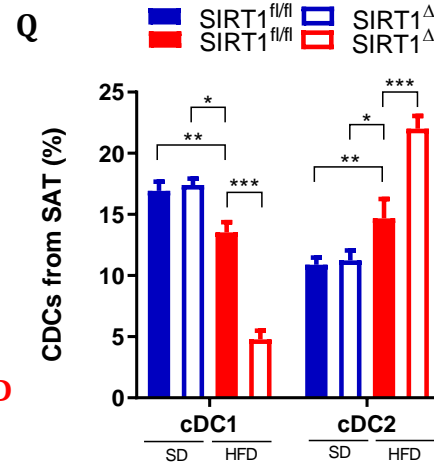
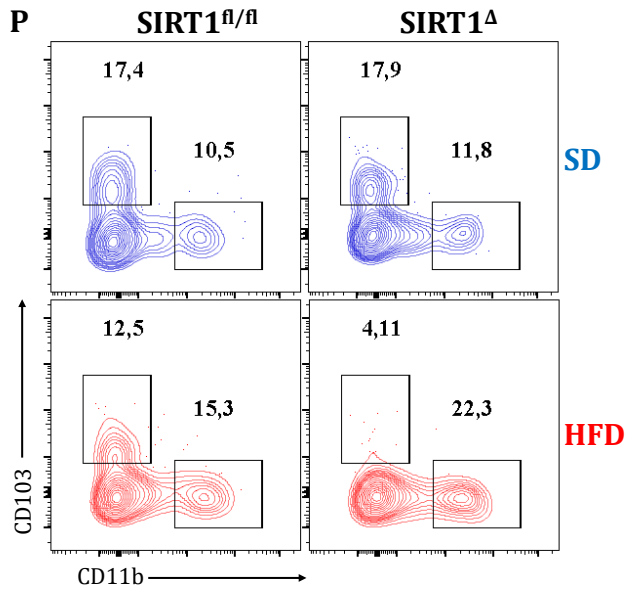
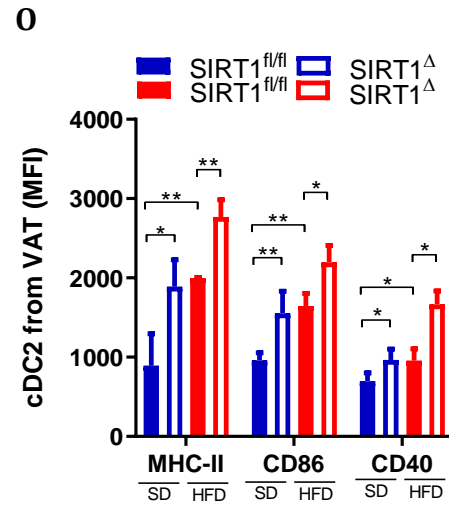
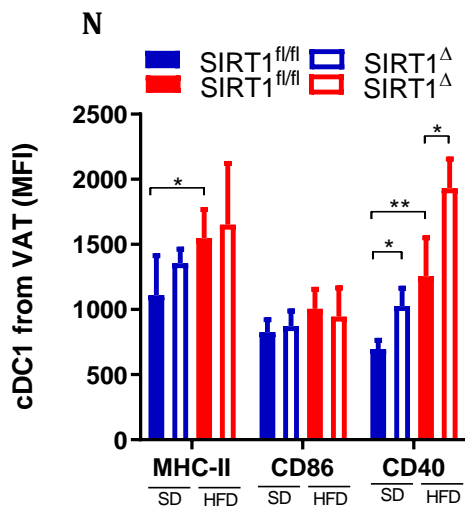


L



M





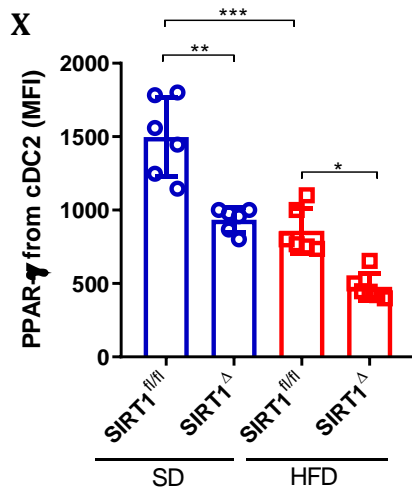
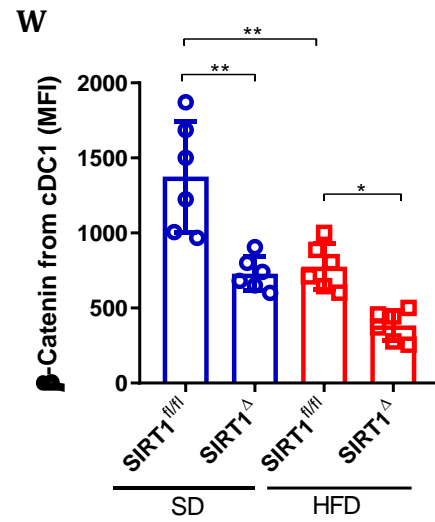
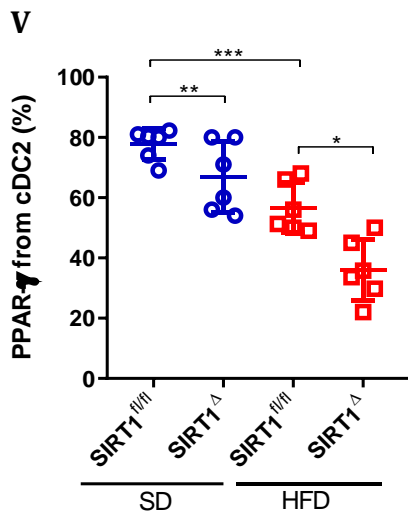
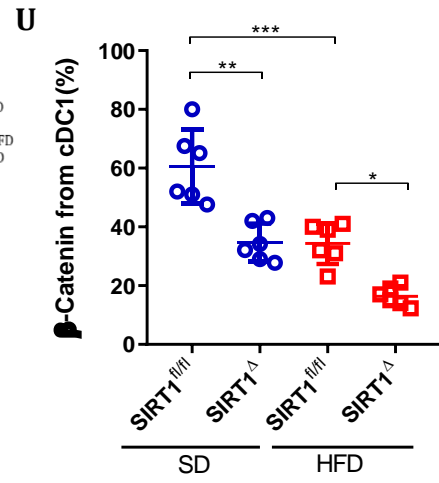
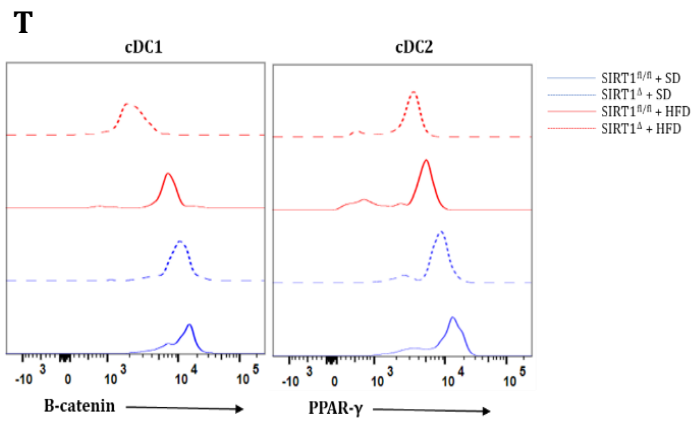


Figura 6 - Animais em HFD sem SIRT1 em DCs, possuem um desbalanço na homeostase sistêmica da glicose, além de possuir diferentes porcentagens de subpopulações de cDCs, as quais estão mais ativadas do que cDCs em animais somente sem SIRT1 em DCs ou unicamente em HFD, principalmente no VAT.

Mensuração da massa corporal (g) dos camundongos de SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD, durante de 12 semanas de dieta (**Figura 6A e 6B**). Teste de tolerância a glicose - GTT (**Figura 6C e 6D**) e de tolerância a insulina - ITT, após 12 semanas de dieta SD e HFD (**Figura 6E e 6F**). Pesagem do tecido adiposo (SAT - inguinal) (**Figura 6G**) e visceral (VAT - perigonadal) (**Figura 6H**). O taxa de troca respiratória (RER) após 12 semanas de dieta SD e HFD (**Figura 6I**). consumo de oxigênio (VO₂) e produção de dióxido de carbono (VCO₂) medido por calorimetria (24h) em animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Figura 6J e 6K**). Porcentagem das subpopulações de cDC1 e cDC2 do VAT (**Figura 6L e 6M**). MFI de MHC-II, CD86 e CD40 nas cDCs de animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Figura 6N-6O**). Porcentagem das subpopulações de cDC1 e cDC2 do SAT (**Figura 6P e 6Q**). MFI de MHC-II, CD86 e CD40 nas cDCs no SAT de animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Figura 6R e 6S**). D MFI de PPAR γ em cDC2 e β -catenina em cDC1 no VAT (**Figura 6T-6X**). Todas as citometrias seguiram a seguinte estratégia de gates (*gated on: Live&Dead-F4/80-CD64-CD11c+IA/IE+CD11b+ouCD103+*) Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 6®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.6 AUSÊNCIA DE SIRT1 EM DCs AFETA ATIVAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE CÉLULAS T

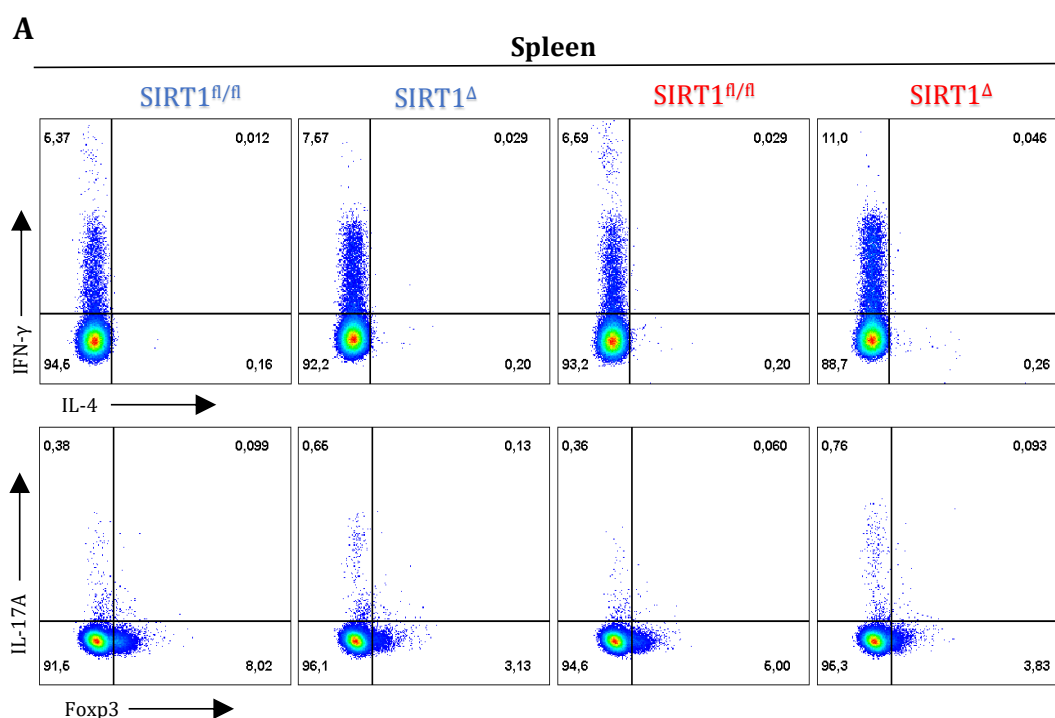
CD4+ *IN VIVO*

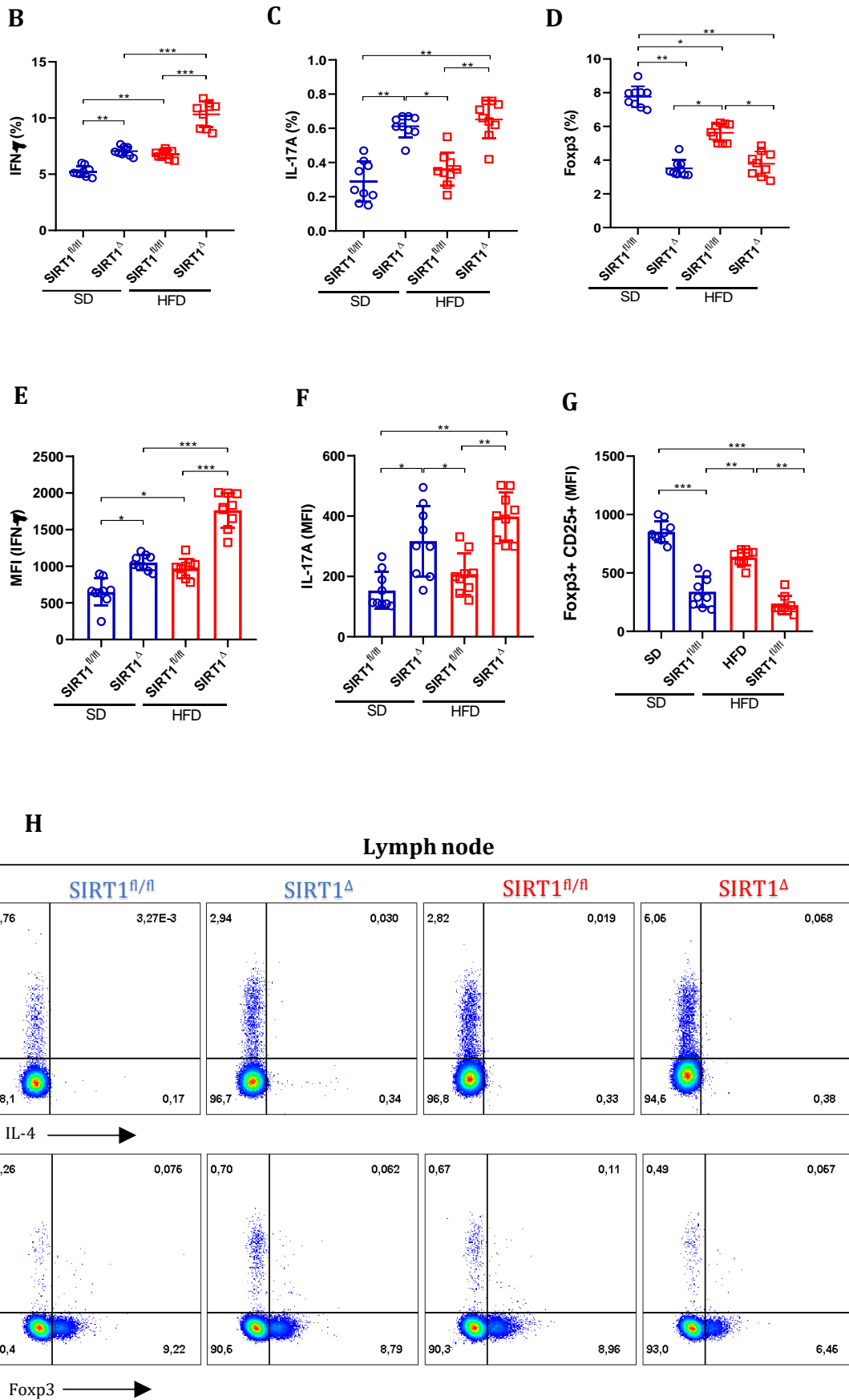
Devido ao fato que SIRT1 e HFD em BMDCs direcionarem a diferenciação, proliferação e ativação de linfócitos T CD4+ *in vitro* (**Figura 3**), procuramos observar se animais SIRT1^Δ também possuíam alterações em linfócitos T CD4+ nos órgãos linfoides secundários.

No baço de animais SIRT1^Δ foi observado um aumento na porcentagem de células T CD4+ expressando IFN- γ quando comparado aos animais SIRT1^{fl/fl}. Além disso, a administração da HFD exacerbou a diferença (**Figura 7A e 7B**). Em contrapartida, o oposto foi observado em relação as T CD4+ expressando Foxp3+. No entanto, não houve efeito aditivo ou sinérgico entre a deleção de SIRT1 e administração de HFD para Foxp3 no baço (**Figura 7A e 7C**). Somente a deleção de SIRT1 e não a HFD, teve efeito de aumentar a porcentagem de linfócitos T CD4+ para IL-17A no baço (**Figura 7A e 7B**). Por fim, o MFI de IFN- γ , IL-17A e de CD25 (em

células CD4+Foxp3+) permaneceram como um reflexo das porcentagens anteriormente mencionadas (**Figura 7E-7G**).

No mesmo *pool* de linfonodos observado para avaliar os subtipos de cDCs anteriormente, foi encontrado maior porcentagem e MFI de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ , quando comparado com linfonodos dos demais grupos de animais, o que foi devido ao efeito aditivo da deleção de SIRT1 em DCs e da obesidade (**Figura 7H, 7I e 7L**). Esse mesmo efeito aditivo não foi observado em relação a produção de IL-17A (**Figura 7H, 7J e 7M**), somente a deleção de SIRT1 ou a HFD promoveu o aumento de IL-17A em linfócitos T CD4+. Diferente do que foi observado no baço, houve um efeito aditivo da deleção de SIRT1 em DCs e HFD em diminuir tanto porcentagem, quanto MFI, de Foxp3 em linfócitos T CD4+ nos linfonodos (**Figura 7H, 7K e 7N**). Por fim, animais SIRT1 Δ em HFD possuíam os maiores níveis de MFI de CD44 e CD69 e os menores níveis do MFI de CD62L (**Figura 7O, 7P e 7Q**).





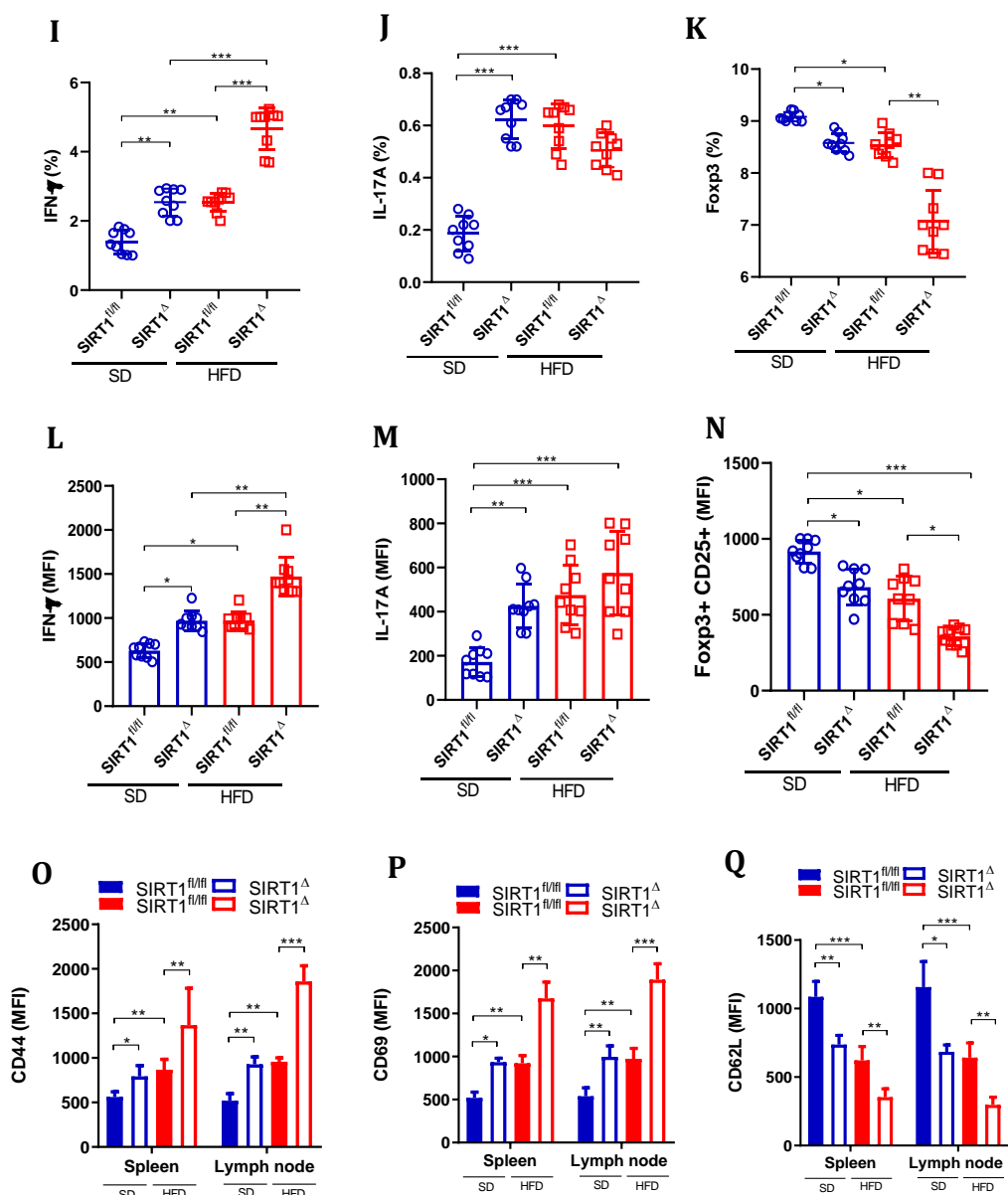


Figura 7 - DCs sem SIRT1, principalmente dentro do contexto da obesidade, alteram a diferenciação e ativação de linfócitos TCD4+ em órgãos linfoides secundários de animais $SIRT1^{fl/fl}$ e $SIRT1^{\Delta}$ em SD ou HFD.

Gráfico de dot plot (*gated on: Live&Dead-TCR β +CD4+*) da produção de citocinas de linfócitos T CD4+ do baço de animais $SIRT1^{fl/fl}$ em SD ($SIRT1^{fl/fl}$), $SIRT1^{fl/fl}$ em HFD ($SIRT1^{fl/fl}$), $SIRT1^{\Delta}$ em SD ($SIRT1^{\Delta}$), $SIRT1^{\Delta}$ em HFD ($SIRT1^{\Delta}$) (Painéis 7A-7D). Porcentagem de linfócitos T CD4+IFN- γ +, IL-17A+ e Foxp3+ em animais foi em $SIRT1^{\Delta}$ em HFD (Painéis 7A-7D). MFI de IFN- γ , IL-17A em linfócitos T CD4+ e de CD25 em células T CD4+Foxp3+ (Painéis 7E-7G). Pseudocolor dot plots de linfócitos T CD4+ de citocinas dos linfonodos (iguinal, braquinal e axial) dos mesmos grupos de animais avaliados para o baço (Painel 7H). Porcentagem de linfócitos T CD4+IFN- γ +, IL-17A+ e a porcentagem de Foxp3+. (Painéis 7I-7K). MFI de IFN- γ e IL 17A em linfócitos T CD4+ e, o MFI de CD25 em células T CD4+Foxp3+ (Painéis 7L-7N). Ta MFI de CD44, CD69 e CD62L em linfócitos T CD4+ (Painéis 7O-7Q). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 6®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.7 ALTERAÇÕES DO FENÓTIPO DE BMDCs/SD E HFD DEPENDENTES DE SIRT1 TEM INFLUÊNCIA DIRETA DO METABOLISMO CELULAR

SIRT1 tem um papel central na regulação do metabolismo celular (HERRANZ et al., 2010; HOUTKOOOPER; PIRINEN; AUWERX, 2012). Essa regulação tem provado ter um papel importante no controle da resposta inflamatória de diversas células (KANG et al., 2020; NIKSERESHT; KHODAGHOLI; AHMADIANI, 2019; OWCZARCZYK et al., 2015; WANG et al., 2016), sendo que, tem sido amplamente demonstrado que o metabolismo celular influencia diretamente a ativação e as funções de DCs (DONG et al., 2020; ELESELA et al., 2020; KATSUYAMA et al., 2020; LEGUTKO et al., 2011). Portanto, avaliamos como SIRT1 altera o metabolismo celular das BMDCs/SD e BMDCs/HFD.

BMDCs/SD possuem menor taxa de consumo de oxigênio (OCR) do que BMDCs/HFD. Além disso, o tratamento com RES teve o potencial de aumentar ainda mais o OCR, principalmente em BMDCs/HFD (**Figura 8A**). Quando administrado o EX-527, foi observado uma redução do OCR em ambas as BMDCs, porém, mais evidente em BMDCs/SD (**Figura 8B**).

Foram calculados diversos parâmetros a partir dos dados do OCR (**Figura 8C**), os quais proporcionaram as seguintes análises: respiração basal, a qual foi aumentada por RES somente em BMDCs/SD; a produção de ATP e o índice de respiração máxima, que foi mais elevado em BMDCs/HFD do que BMDCs/SD, sendo que RES aumentou esses dois parâmetros principalmente em BMDCs/HFD, ao contrário da produção de ATP e da respiração máxima; o *proton leak* foi diminuído

por RES principalmente em BMDCs/SD; a capacidade de reserva foi aumentada em ambas as BMDCs, no entanto, mais efetivamente em BMDCs/HFD.

Com EX-527, BMDCs/HFD reduziram a produção de ATP e a respiração máxima celular. Entretanto, EX-527 reduziu mais efetivamente a respiração de máxima BMDCs/SD. Observamos um efeito aditivo por EX-527 e a obesidade em aumentar o *proton leak*. Por outro lado, observamos um efeito aditivo por EX-527 e a obesidade em diminuir a capacidade de reserva de ambas as células, porém houve uma maior redução em BMDCs/HFD. Interessantemente, houve um aumento da respiração não mitocondrial somente em BMDCs/HFD com EX-527 em HFD (**Figura 8D**).

Quando avaliado a taxa de acidificação extracelular (ECAR), percebemos que as BMDCs/HFD também possuem maior ECAR quando comparado com as BMDCs/SD. Em contrapartida ao OCR, RES diminuiu o ECAR de ambas as BMDCs (**Figura 8E**). Outro contra ponto é o fato do EX-527, em ambas BMDCs, aumentar o ECAR, principalmente em BMDCs/HFD (**Figura 8F**).

De maneira suplementar aos dados de ECAR, calculamos alguns parâmetros da via da glicólise (**Figura 8G e 8H**): a glicólise de ambas as BMDCs foi diminuída por RES e aumentada por EX-527. De um lado, RES diminuiu drasticamente a glicólise em BMDCs/SD, enquanto EX-527 aumentou de maneira mais representativa em BMDCs/HFD; a capacidade glicolítica foi reduzida por RES somente em BMDCs/SD e o EX-527 aumentou essa capacidade nos dois grupos de BMDCs. Não encontramos alterações na reserva glicolítica entre os grupos avaliados.

Foi observado que RES aumentou a massa mitocondrial igualmente para BMDCs/SD e HFD, o que EX-527 não pode proporcionar (**Figura 8I e 8J**). Através do ensaio de TMRE, verificamos que o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi alterado por RES somente em BMDCs/HFD, mas o EX-527 acabou reduzindo o $\Delta\Psi_m$ de ambas as BMDCs (**Figura 8K e 8L**).

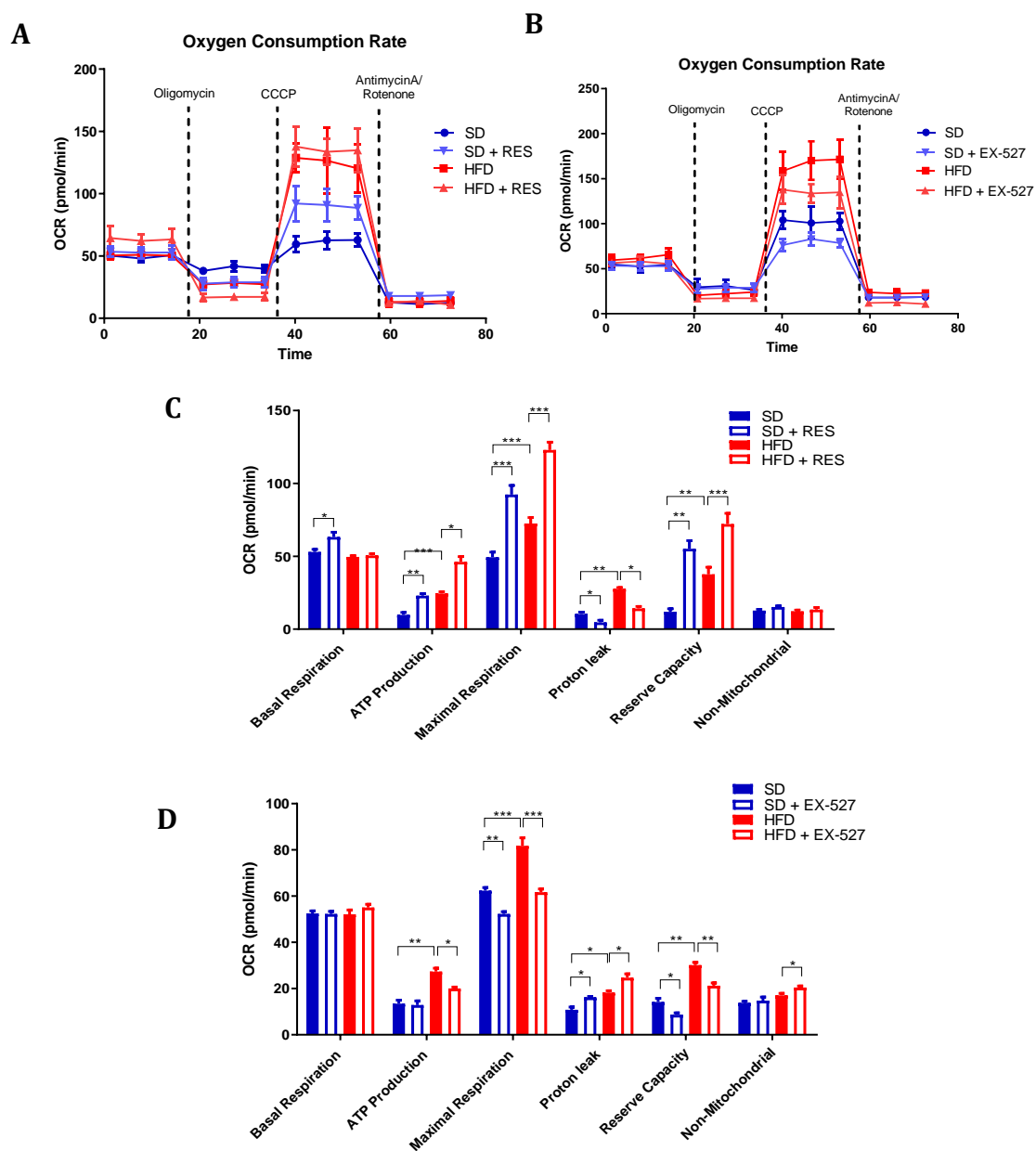
Devido ao fato do processo de oxidação de ácidos graxos ser um dos principais elementos para uma alta respiração mitocondrial (BENADOR et al., 2018), inclusive em células do sistema imune (HODA BADR, CINDY L. CARMACK, DEBORAH A. KASHY, MASSIMO CRISTOFANILLI, 2011; NOMURA et al., 2016; XIAO et al., 2016), nós avaliamos a quantidade de *droplets* lipídicos nas BMDCs/SD e HFD e, se SIRT1 poderia modular esse fator.

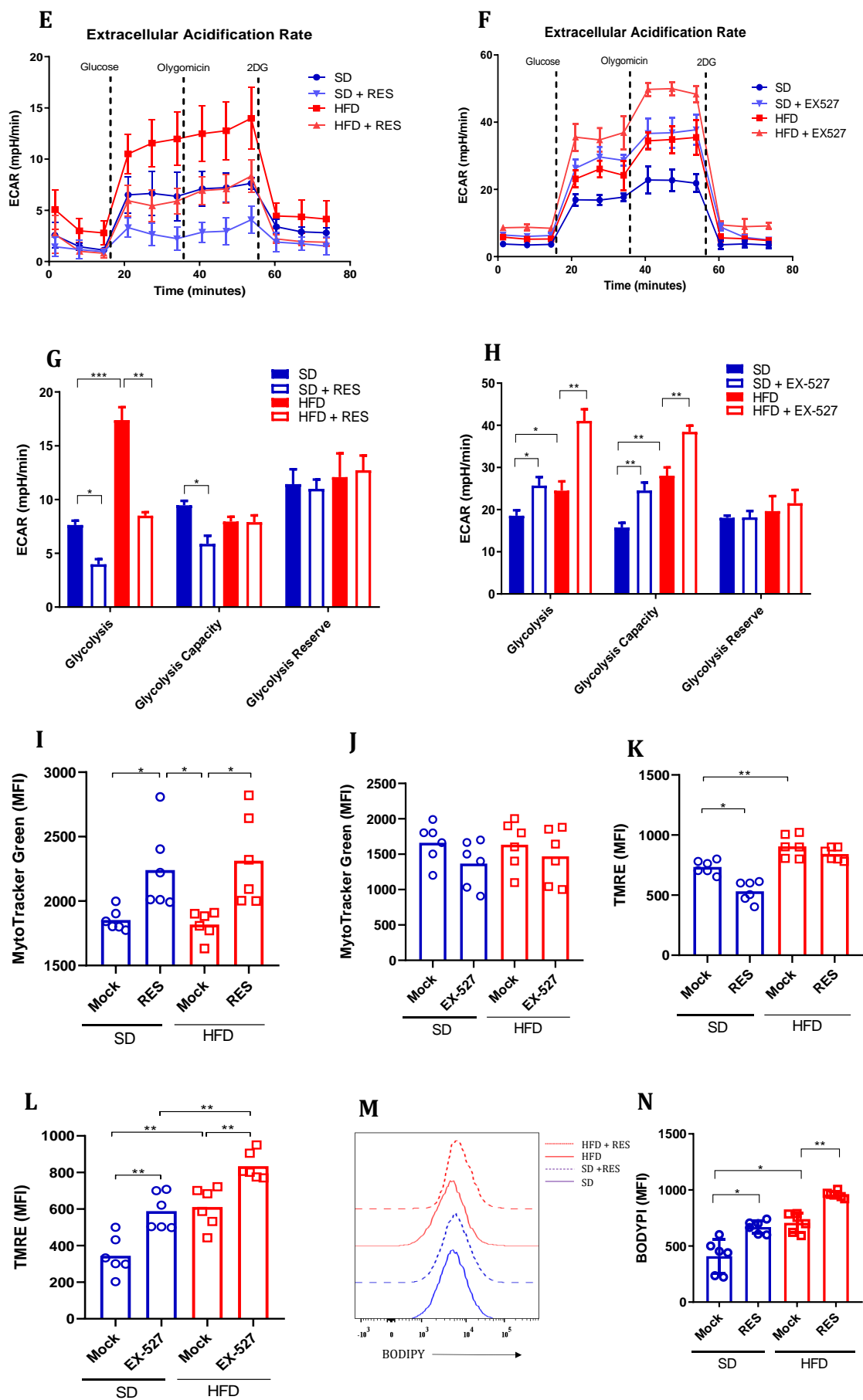
Seguindo os passos da literatura (GARCÍA NORES et al., 2016; MINHAS et al., 2019), BMDCs/HFD possuem maiores quantidades de *droplets* lipídicos e o tratamento com RES diminuiu esse fator principalmente em BMDCs/SD, enquanto EX-527 aumentou principalmente em BMDCs/HFD (**Figura 8M-8P**).

Também avaliamos CD36 em BMDCs/SD e HFD. O CD36 é uma proteína intermembrana que permite a entrada de ácidos graxos para o interior da célula, o que tem extrema importância para o *fitness* da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (JOGLE; TONG, 2003). BMDCs/HFD possuem um MFI mais elevado de CD36 do que BMDCs/SD, sendo que RES aumenta esse MFI somente em BMDCs/ HFD (**Figura 8Q**). Porém, EX-527 diminui o MFI em ambas as BMDCs (**Figura 8R**).

Por fim, o sobrenadante das BMDCs/SD, ainda mais daquelas tratadas com RES, possuíam maiores quantidades de glicose do que lactato. O inverso aconteceu

com as BMDCs com EX-527, que possuíam os níveis mais altos de lactato e os menores de glicose (**Figura 8S**). Em paralelo a isso, observamos uma diminuição considerável da expressão de *Glut1* em ambas BMDCs tratadas com RES e um aumento quando essas células foram tratadas com EX-527 (**Figura 8T e 8U**). Essa modulação da expressão de *Glut1* corrobora o aumento da captação glicose, potencializado pelo tratamento de EX-527 e diminuído por RES em ambas BMDCs avaliadas (**Figura 8V e 8W**).





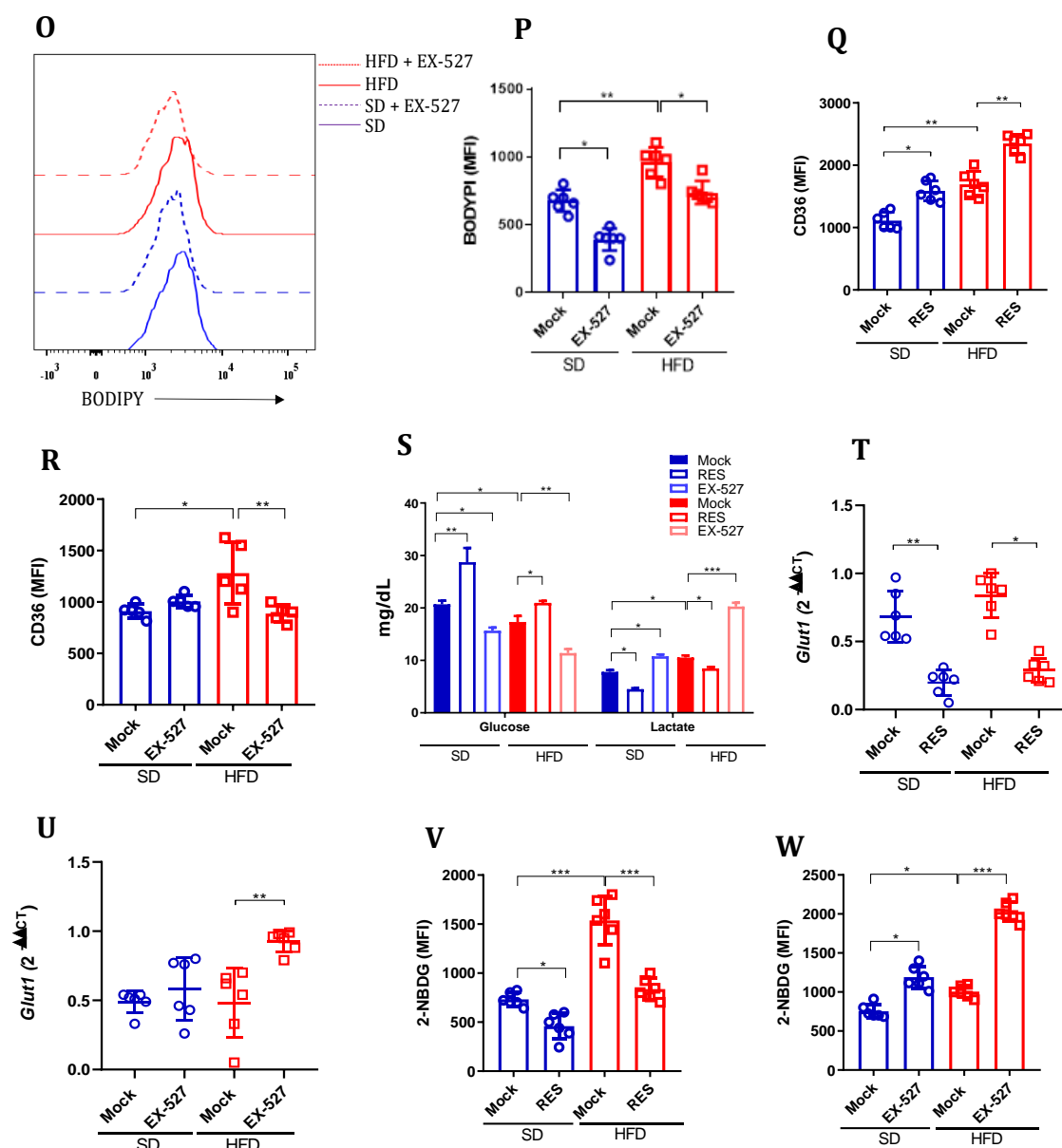


Figura 8 - Tanto o processo de OXPPOS quanto de glicólise das BMDCs, são afetadas pela administração de HFD *in vivo* e pela modulação de SIRT1 *in vitro*.

Cell Mitostress assay (XF-96 Extracellular Flux Analyzer - Seahorse®, Agilent Bioscience) de BMDCs/SD e HFD (células CD11c+ isoladas da cultura de BMDCs) tratadas com (100 μ M/24h) e EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7A e 7B**). Com os dados de OCR foi calculado a respiração basal, produção de ATP, *proton leak*, respiração máxima, capacidade de reserva e respiração não mitocondrial de BMDCs/SD e HFD tratadas com (100 μ M/24h) e EX-527 (20 μ M/24h) (**Painel 7C e 7D**). *Cell Glycolytic Stress assay* (XF-96 Extracellular Flux Analyzer - Seahorse®, Agilent Bioscience) de BMDCs/SD e HFD tratadas com (100 μ M/24h) e EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7E e 7F**). Com os valores de ECAR foram calculados os valores da glicólise, capacidade e reserva glicolítica de BMDCs/SD e HFD tratadas com (100 μ M/24h) e EX-527 (20 μ M/24h) (**Painel 7G e 7H**). Por citometria de fluxo (*gated on*: Live&Dead-CD11c+IA/IE+CD135+), verificamos o MFI da massa mitocondrial, via MitoTracker™Green (invitrogen) de ambas as BMDCs com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7I e 7J**). MFI do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), via TMRE (Abcam) com BMDCs/SD e HFD tratadas com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7K e 7L**). Porcentagem do número máximo de células adquiridos e MFI de BODIPY (Invitrogen)/droplets lipídicos de BMDCs/SD e HFD com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7M-7P**) e MFI de CD36 nas mesmas células com os mesmos tratamentos (**Painéis 7Q-7R**). Dosagem de glicose e lactato no sobrenadante das BMDCs/SD e HFD tratadas com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painel 7S**). Por qPCR, expressão de *Glut1* ($2^{-\Delta\Delta CT}$ /fold change relativo ao mRNA de B-

actina) de BMDCs/SD e HFD tratadas com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7T e 7U**). MFI de 2-NBDG (25 μ M/ 25 minutos à 37 °C) simulando o *uptake* de glicose em BMDCs/SD e HFD tratadas com RES (100 μ M/24h) ou EX-527 (20 μ M/24h) (**Painéis 7V e 7W**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8[®]. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.8 A VIA DE QUINURENINA É REGULADA POR SIRT1 EM DCS

O triptofano é um aminoácido essencial utilizado na geração *de novo* de NAD⁺, principalmente a partir da clivagem do próprio triptofano pela enzima isoforma 1 da enzima Indolamina 2,3-dexóxiase (IDO1) ou pela isoforma 1 e 2 da triptofano 2,3-dexóxiase IDO1/2, gerando quinurenina, a qual pode ser secretada ou dar origem a reações enzimáticas subsequentes para geração de NAD⁺ (**Figura 9A**) (BADAWY, 2017; EVANS et al., 2002).

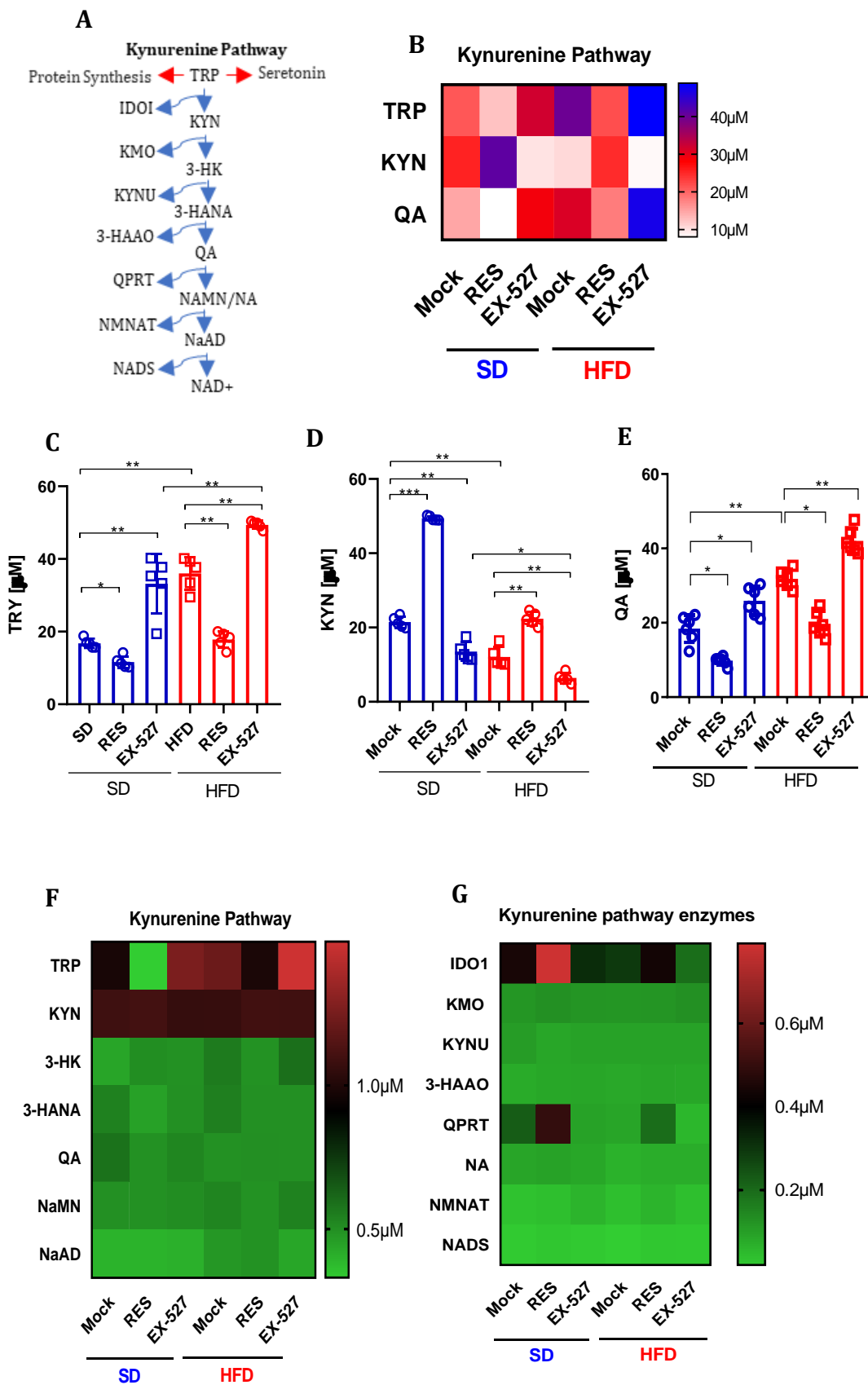
Sabendo do papel fundamental de NAD⁺ na atividade de SIRT1 (CHANG; GUARENTE, 2014; ELESELA et al., 2020; GERTZ et al., 2013), avaliamos por LC-MS/MS moléculas da via da quinurenina, tanto no sobrenadante quanto no conteúdo proteico intracelular das BMDCs/SD e HFD. Observamos que as quantidades de triptofano (TRP) e de ácido quinolínico (QA) diminuíam ou aumentavam no sobrenadante das BMDCs/SD e HFD, se aplicado o tratamento de RES ou EX-527, respectivamente. Em contrapartida, níveis de quinurerina (KYN) foram aumentados no sobrenadante de ambas as BMDCs por RES e diminuídos por EX-527 (**Figura 9B-9E**).

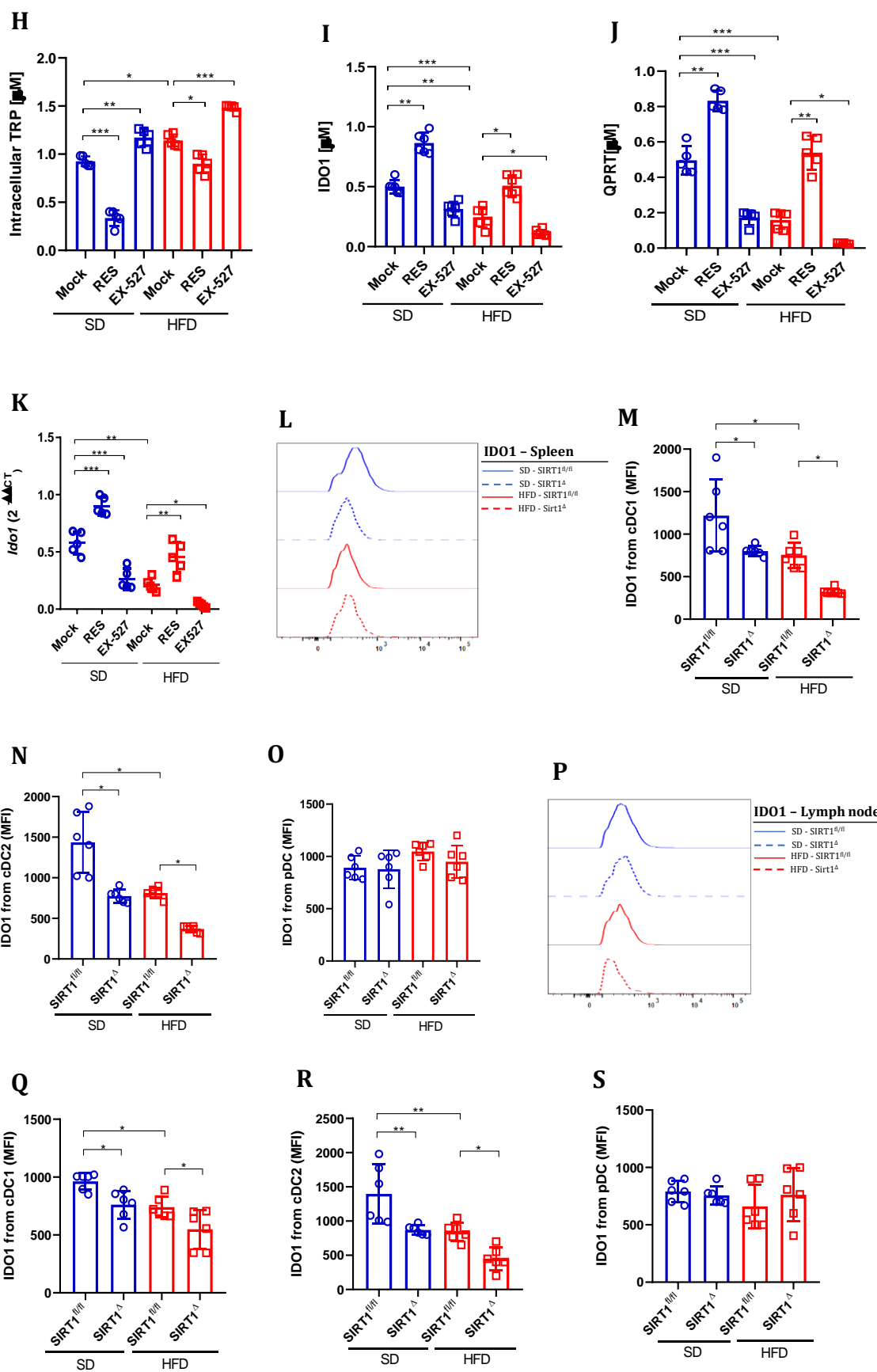
No conteúdo intracelular, o TRP foi modulado por RES e EX-527 de maneira similar ao observado no sobrenadante das BMDCs/SD e HFD (**Figura 9F e 9H**). Complementar a isso, IDO1 e a enzima quinolinato fosforibosiltransferase (QPRT)

foram aumentadas por RES em ambas as BMDCs, porém, esse aumento foi diferente entre as células derivadas de animais em SD e HFD. O EX-527 possui efeito oposto sob IDO1 e QPRT, diminuindo drasticamente os níveis dessas enzimas em BMDCs/HFD (**Figura 9G, 9I e 9J**). Além das alterações observadas por LC/MS-MS em IDO1, o mesmo foi observado em relação a expressão gênica de *Ido1* (**Figura 9K**).

Em animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ sob HFD, avaliamos como estava a expressão de IDO1 em cDCs e pDCs nos órgãos secundários desses animais. De maneira similar ao observado *in vitro*, tanto em porcentagem relativa ao número máximo de células, quanto em MFI, as cDCs do baço e dos linfonodos tiveram um efeito aditivo na redução de IDO1, devido a deleção de SIRT1 em DCs e administração de 12 semanas de HFD (**Figura 9L-9S**). Somado a isso, observamos que no VAT dos animais SIRT1^Δ houve uma redução no MFI de IDO1, o que foi exacerbado quando esses animais eram obesos (**Figura 9T**).

Analisando dados de transcriptoma de um estudo prévio em humanos, no qual pacientes obesos foram tratados por 30 dias com resveratrol (150 mg/dia)(KONINGS et al., 2014), a IDO1 estava aumentada no VAT de pacientes tratados com RES (**Figura 9U**). As vias de desacetilação e biossíntese de NAD⁺ (realizado pela via do triptofano/quinurenina) estavam diferencialmente reguladas entre os pacientes tratados com RES e placebo (**Figura 9V**).





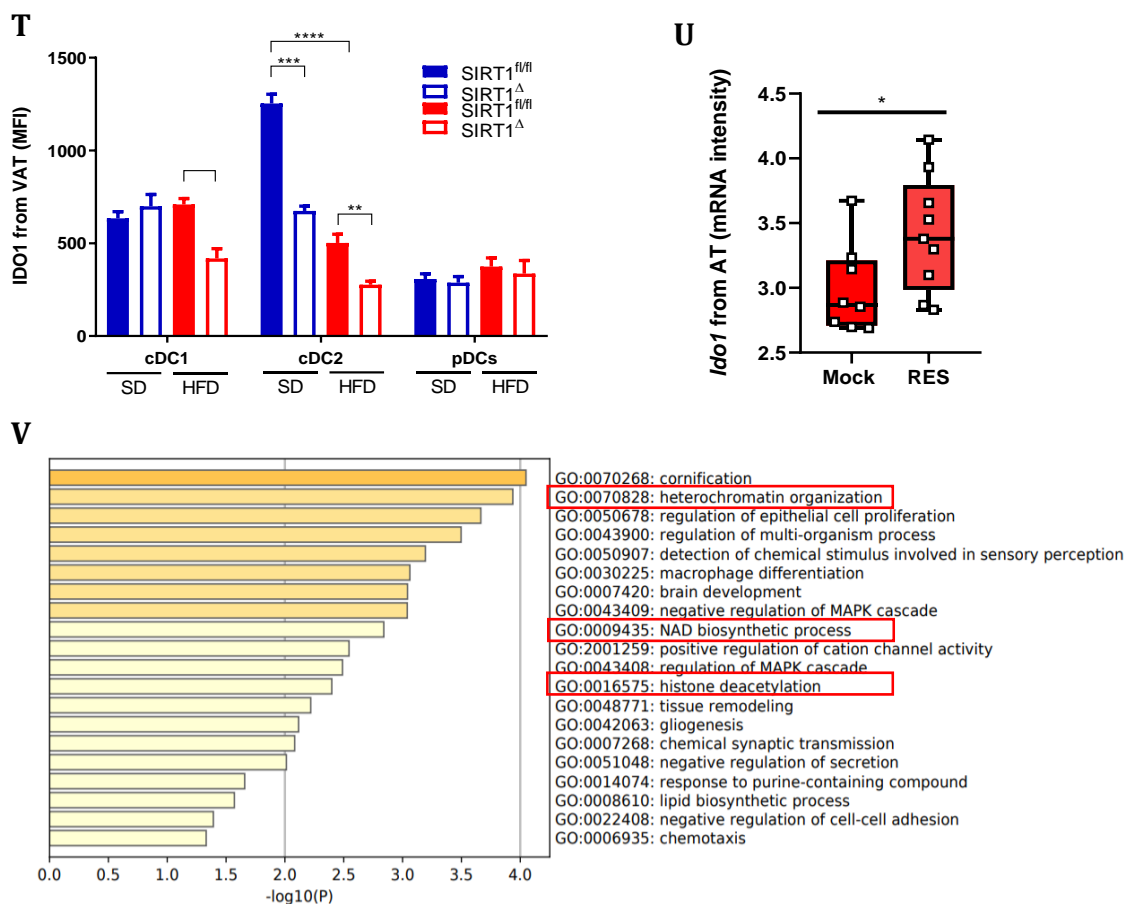


Figura 9 - SIRT1 regula o funcionamento de uma das vias catabólicas do triptofano em DCs, as quais estão em órgãos linfóides secundários e no VAT de camundongos, assim como no VAT de pacientes obesos.

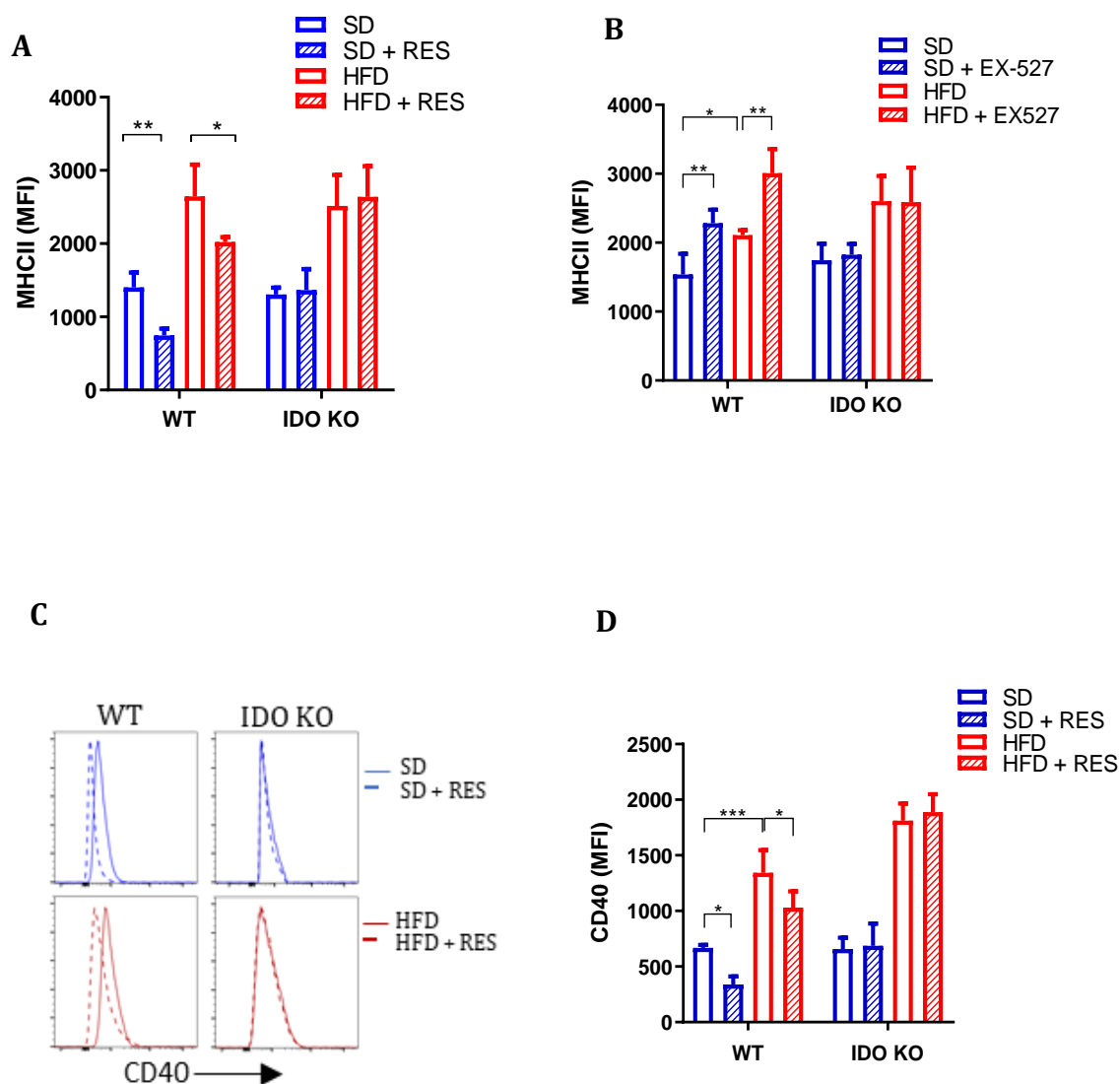
Via catabólica do triptofano com ênfase no eixo da metabolização do intermediário de quinurenina (KYN) (**Painel 8A**). LC/MS-MS quadro duplo poro do sobrenadante de BMDCs/SD e HFD, tratadas com RES (100 $\mu\text{m}/24\text{h}$) e EX-527 (20 $\mu\text{m}/24\text{h}$), demonstrando os níveis dos intermediários detectáveis (**Painel 8B**): triptofano (TRP) (**Painel 8C**), quinurenina (KYN) (**Painel 8D**) e de ácido quinolínico (QA) (**Painel 8E**). LC-MS/MS do conteúdo proteico total das BMDCs/SD e HFD, tratadas com RES (100 $\mu\text{m}/24\text{h}$) e EX-527 (20 $\mu\text{m}/24\text{h}$), demonstrado por dois *heat-maps*, um com os intermediários metabólicos (**Painel 8F**) e outro com as principais enzimas da via da quinurenina (**Painel 8G**): triptofano (TRP) (**Painel 8H**); quinurenina (KYN); 3-hidróxi quinurenina (3-HK); ácido 3-hidroxiantranílico ácido quinolínico (3-HANA); ácido quinolínico (QA); ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN); ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD); Indolamina 2,3-dexógenase (IDO1) (**Painel 8I**); quinurenina 3-monooxigenase (KMO); quinurenase (KYNU); 3-hidroxiantranilato oxidase (3-HAAO); Quinolinato de fosforibosil transferase (QPRT) (**Painel 8J**); Nicotina acil-transferase (NA) e NAD sintetase (NADs). Por qPCR, expressão de *Ido1* ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ /fold change relativo ao mRNA de *B-actina*) de BMDCs/SD e HFD tratadas com RES (100 $\mu\text{m}/24\text{h}$) e EX-527 (20 $\mu\text{m}/24\text{h}$) (**Painel 8K**). Por citometria de fluxo (*gated on*: Live&Dead-F4/80-CD64-CD11c+IA/IE+CD11b+ouCD8 α), porcentagem de IDO1 em relação ao número máximo de células adquirido do baço de animais SIRT1 Δ/Δ e SIRT1 $^{fl/fl}$ em SD e HFD (**Painel 8L**). No mesmo tipo de órgão e entre os mesmos grupos, MFI de IDO1 nas cDC1 (**Painel 8M**), cDC2 (**Painel 8N**) e pDCs (**Painel 8O**). Por citometria de fluxo, porcentagem de IDO1 em relação ao número máximo de células adquirido dos linfonodos (inguinal, braquial e axilar) de animais SIRT1 Δ/Δ e SIRT1 $^{fl/fl}$ em SD e HFD (**Painel 8P**). Nos mesmos linfonodos e entre os mesmos grupos, MFI de IDO1 nas cDC1 (**Painel 8Q**), cDC2 (**Painel 8R**) e pDCs (**Painel 8S**). O MFI de IDO1 nas cDCs do VAT dos animais SIRT1 Δ/Δ e SIRT1 $^{fl/fl}$ em SD e HFD (*gated on*: Live&Dead-F4/80-CD64-CD11c+IA/IE+CD11b+CD103+) (**Painel 8T**). Análise pela plataforma GEO2R do banco de dados GSE42432, o qual representa a intensidade de mRNA/ Log_2 de IDO1 apartir de dados de RNAseq de AT de pacientes obesos tratados com placebo (Mock) e 150 mg/ml de resveratrol (RES) (**Painel 8U**). Análise pela plataforma MetascapeTM de vias metabólicas (KEGG pathway) e sinalização celular (GO *datasets*) diferentemente reguladas entre pacientes obesos tratados com placebo (Mock) e 150 mg/ml de resveratrol (RES) do estudo

GSE42432 (**Painel 8T**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001; ****= p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.9 AUSÊNCIA DE IDO INTERFERE NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE BMDCs/SD E HFD POR SIRT1

Com intuito de confirmar se SIRT1 depende de IDO1 e, conseqüentemente, de uma via ativa da quinurenina para promover alterações nas funções de DCs, engordamos animais WT e IDO *knockout* (IDO KO), isolamos BMDCs desses animais e tratamos com RES e EX-527 ou não. Coerente com nossa hipótese, BMDCs/SD e HFD de animais WT tratadas com RES tiveram redução na expressão das moléculas de MHCII e CD40, como demonstrado anteriormente. Porém, as mesmas BMDCs derivadas de animais IDO KO não tiveram redução nessas moléculas quando tratadas com RES (**Figura 10A-9C**). Além disso, o efeito de aumentar a expressão dessas moléculas em BMDCs/SD e HFD de animais WT, observado após o tratamento com EX-527, foi perdido quando o mesmo tratamento foi aplicado as BMDCs/SD e HFD de animais IDO KO (**Figura 10D-10E**). Outra perda de função observada foi em relação a produção de duas citocinas; quando BMDCs/SD e HFD de animais WT foram tratadas com RES houve a diminuição de IL12-p40 no sobrenadante e um aumento de TGF- β como observado em experimentos anteriores (**Figura 2**). Entretanto, o mesmo efeito deste tratamento não foi visto na produção de IL-12p40 e TGF- β pelas BMDCs/SD e HFD de animais IDO KO (**Figura 10F-10G**). O efeito anteriormente observado no aumento de IL-12p40 e TGF- β por EX-527, também não foi perceptível nas BMDCs/SD e HFD de animais IDO KO (**Figura 10H-10I**).

Nós avaliamos a expressão de CD86, CD80, assim como a produção de IL-6, IL-1 β e IL-10 em BMDCs/SD e HFD de animais IDO KO, pois tínhamos observado alterações com o tratamento com RES e EX-527 em BMDCs/SD e HFD de animais WT. Mesmo na ausência de IDO, o efeito modulador das drogas se manteve (dados não demonstrados).



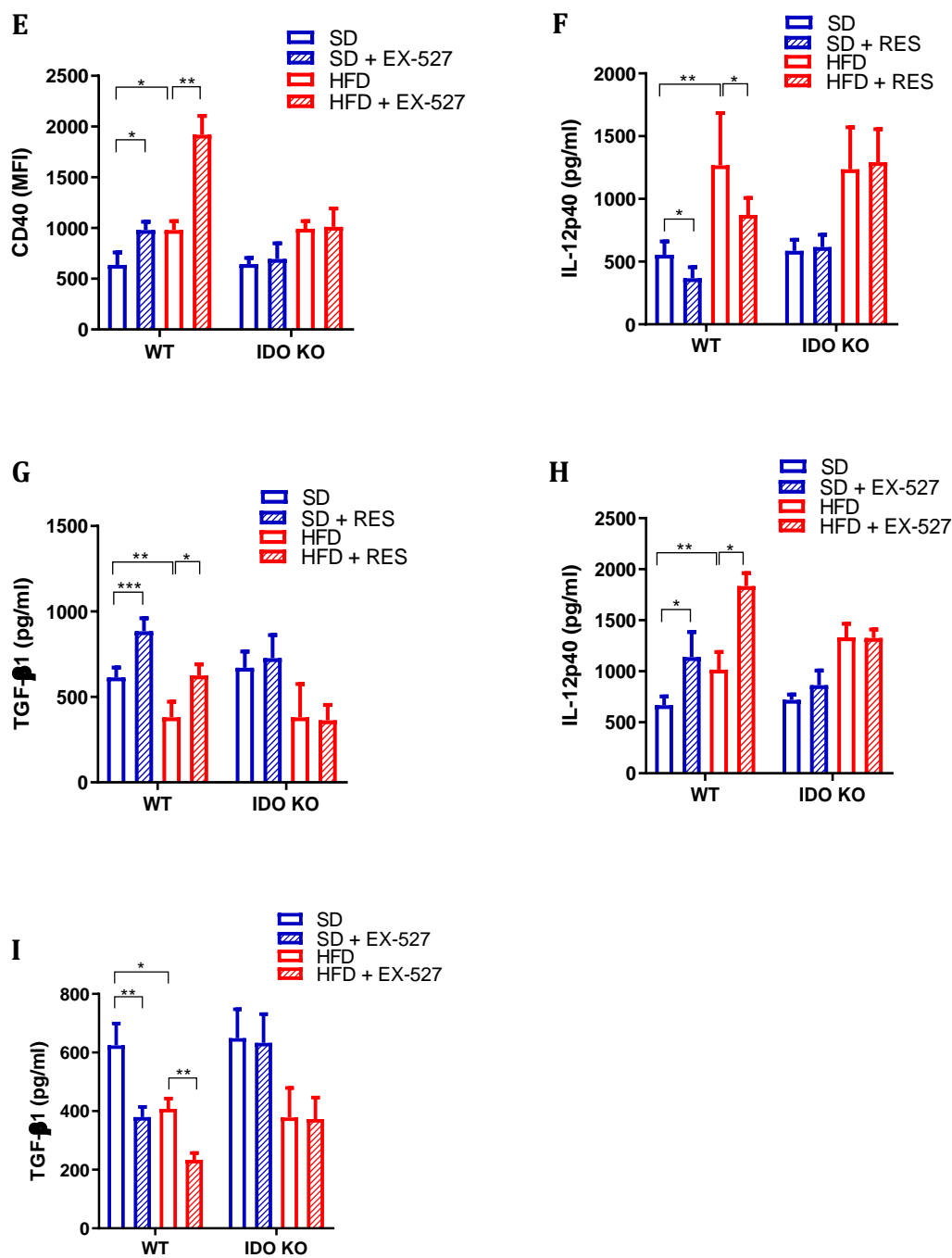


Figura 10 - Ausência de IDO interfere na modulação do fenótipo de BMDcs/SD e HFD por SIRT1.

Por citometria de fluxo (*gated on: Live&Dead-CD11c+IA/IE+CD135*) MFI de MHC-II das BMDcs/SD e HFD derivadas de animais *wild type* (WT) e IDO KO com RES (100 μ m/24h) e EX-527 (20 μ m/24h) (**Painéis 10A e 10B**). MFI e porcentagem de CD40 para o número máximo de eventos adquiridos em BMDcs/SD e HFD derivadas de animais *wild type* (WT) e IDO KO com RES e EX-527 (**Painéis 10C e 10D**), assim como produção de IL-12p40 e TGF- β por ELISA (**Painéis 10E-10H**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8[®]. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3-6 animais por grupo, com duas ou três repetições experimentais.

4.10 DELEÇÃO DE SIRT1 EM DCs E A OBESIDADE NÃO TEM EFEITO ADITIVO NA REJEIÇÃO DE ENXERTO SÓLIDOS

Para avaliar o efeito da deleção de SIRT1 em DCs na obesidade e na rejeição de transplantes sólidos, realizamos o transplante de pele semi-alogênico em camundongos SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ magros ou obesos.

Após 10 dias de observação, a curva de sobrevivência dos enxertos revelou que animais SIRT1^Δ e SIRT1^{fl/fl} não apresentaram diferenças entre a porcentagem de rejeição entre os enxertos, tanto entre os animais magros, quanto nos animais obesos (**Figura 11A e 11B**).

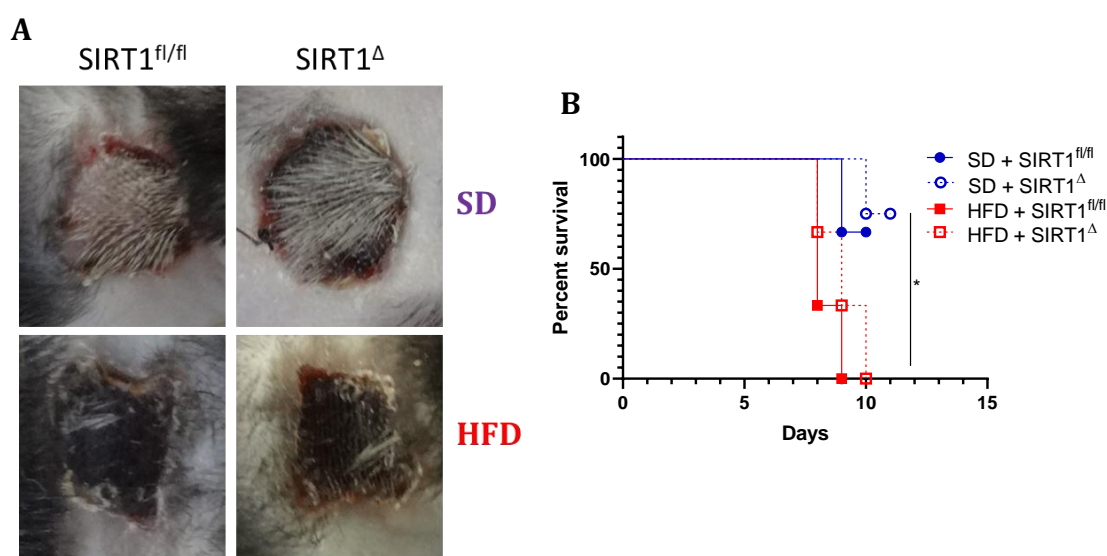


Figura 11- A deleção de SIRT1 em DCs e a obesidade não influenciaram diretamente na rejeição do enxerto de pele semi-alogênico

Após de 10 dias, os enxertos de pele foram avaliados de acordo com os pontos de necrose e pela curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* de animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ em SD e HFD (**Painel A e B**). Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: *= p < 0,05; **= p < 0,01; ***= p < 0,001; ****= p < 0,0001, os quais foram estabelecidos pelo teste Logrank e Gehan-Breslow-Wilcoxon tests, utilizando o software GraphPad Prism 8®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3 animais por grupo, com uma repetição.

5. DISCUSSÃO

A SIRT1 tem papel central no metabolismo celular em diversos tipos de células do sistema imune, as quais possuem fenótipo e funções influenciadas pela sua atividade (BEIER et al., 2012; CANTÓ; MENZIES; AUWERX, 2015; CHAO et al., 2017; WANG et al., 2016). Nós observamos que SIRT1 tem um papel importante na ativação, fenótipo e no metabolismo de DCs. Outros autores também observaram impacto da atividade de SIRT1 em DCs (ALVAREZ et al., 2012; OWCZARCZYK et al., 2015; WOO et al., 2016). Todavia, neste projeto, verificamos que a obesidade reduz tanto a presença quanto a atividade de SIRT1 em DCs, que culminou numa maior ativação dessas células, representada pela expressão exacerbada de marcadores clássicos de ativação de APCs. A consequência da falta de SIRT1 em cDCs no tecido adiposo de animais obesos se associou a maior intolerância à glicose e resistência à insulina.

As BMDCs/HFD, com a presença e atividade reduzida de SIRT1, têm tanto porcentagem quanto MFI de MHCII mais elevadas do que as BMDCs/SD. Em acréscimo, o MFI de CD86 e CD40 também são mais elevados em BMDCs/HFD. Algo interessante de se notar é que as células progenitoras na medula óssea se diferenciam em um microambiente basal inflamado, como na obesidade, posteriormente, residem em diferentes tecidos, e possuem alterações que podem determinar a resposta inflamatória local e sistêmica (ADLER; KAUSHANSKY; RUBIN, 2014; BILWANI; KNIGHT, 2012; DING; MORRISON, 2013; YOKOTA et al., 2003).

Evidências apresentam uma comunicação multidirecional entre três peças-chaves na homeostase sistêmica: dieta, sistema imune e a microbiota convencional

(ABT et al., 2012; DE VADDER et al., 2016; KOH et al., 2016). Em 2019, foi demonstrado que a restrição calórica em animais afeta diretamente a distribuição de células T de memória circulante. Essas células migram para a medula óssea, onde as quantidades alteradas de eritrócitos, adipócitos e glicocorticoides aumentam a expressão de CXCR4 e BCL-2, o que contrasta com a diminuição da sinalização da via mTOR e, por consequência, prolonga a sobrevivência dessas células, além de aumentar as funções supressoras de patógenos e tumores das células T de memória (COLLINS et al., 2019).

Em contrapartida, através da administração de uma dieta hiperlipídica, foi observado que células tronco hematopoiéticas aumentam a quantidade de *lipids rafts* (LR) na superfície celular, o que promove uma quebra de quiescência pela falta da sinalização de TGF- β , e acaba resultando na diferenciação prematura dessas células que, por consequência, acaba afetando células progenitoras e já diferenciadas do sistema imune (MONDANELLI et al., 2017). Em acréscimo, foi demonstrado que a microbiota de animais em HFD alterou a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea (LUO et al., 2015). Nesse estudo, mudanças na microbiota e grandes quantidades de adipócitos na medula óssea de animais obesos promoveram o aumento do número de progenitores mielóides e alterações em fatores solúveis que alteram a diferenciação funcional de células progenitoras na medula (LUO et al., 2015). Outro estudo demonstrou que a citocina TGF- β está regulada negativamente na medula óssea de animais em HFD (CORTEZ et al., 2013). Em contrapartida, TNF- α , IL-6 e IL-1 β estavam elevadas na medula óssea de animais obesos (CORTEZ et al., 2013). Como esperado e reportado anteriormente, as BMDCs derivadas de animais obesos possuem maiores

quantidades de MHC de classe II e de coestimuladores, o que contrasta com a regulação negativa da produção de IL10, IL-4 e TGF- β (MACIA et al., 2006; PLUBELL et al., 2018). Estes resultados sugerem que os progenitores de DC na medula óssea podem emigrar para um ambiente inflamatório, que poderia potencializar o fenótipo inflamatório observados na DC de animais obeso no tecido adiposo. De fato, foi mostrado que a obesidade gera mudanças persistentes nas células precursoras de DCs, por influenciar o eixo Adam17-MAPKp38 (JAISWAL et al., 2020). No entanto, pouco foi relacionado com a expressão e atividade de SIRT1, como foi visto nos resultados deste trabalho. Uma questão interessante seria explorar o papel de SIRT1 nesses progenitores em ditar o fenótipo das células imunes, em especial as DCs na periferia.

O tratamento com RES, possivelmente pelo aumento na atividade de SIRT1 em BMDCs/HFD, promoveu a redução da expressão proteica de MHC de classe II, CD86 e CD40. Sendo assim, após o tratamento com RES, as BMDCs/HFD acabam restaurando a expressão dessas moléculas para níveis semelhantes aos de BMDCs/SD. Além disso, o mesmo ocorreu em relação à expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias. Reforçando a hipótese de que SIRT1 é importante para modular o fenótipo de BMDCs. Similarmente, quando essas células foram tratadas com o inibidor seletivo de SIRT1 (EX-527), percebemos o efeito contrário sob o fenótipo das BMDCs/SD e HFD. O fato de BMDCs tratadas com RES produzirem maiores quantidade de TGF- β e menores de IL-12p40 e o EX-527 ter causado o efeito oposto, foi condizente com a maior polarização para células Treg (CD25+Foxp3+) ao invés da geração de células Th1 (MARKS et al., 2017; REINHARDT et al., 2006).

Esse perfil tolerogênico em DCs e a redução de Th1 observado por nós, após o aumento da atividade de SIRT1 em DCs pelo tratamento com RES, pode estar relacionado com atividade de SIRT1 sob o NF- κ B (CUI et al., 2016; DE GREGORIO et al., 2020; KAUPPINEN et al., 2013; SCUTO et al., 2013). O NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição indutores de diversas citocinas pró-inflamatórias e proteínas de superfície associadas com a resposta imune (LIU et al., 2017; NAPETSCHNIG; WU, 2013; TANIGUCHI; KARIN, 2018), as quais são essenciais para a função de APC das DCs (BROWN et al., 2019; EISENBARTH, 2019; SCHLITZER; GINHOUX, 2014) e que também são reduzidas na presença e maior atividade de SIRT1 neste trabalho.

Dois *motifs* na fração N-terminal de SIRT1 são responsáveis por boa parte das ações de SIRT1, inclusive por promover a desacetilação de fração p65 do NF- κ B (GHISAYS et al., 2015). Ainda corroborando com nossos dados, estudos prévios tanto na obesidade, quanto em outros contextos demonstram que o tratamento com RES reduz a presença e atividade de NF- κ B (JIMENEZ-GOMEZ et al., 2013; MANNA; MUKHOPADHYAY; AGGARWAL, 2000; XU et al., 2018).

Aparentemente, o perfil inflamatório basal das BMDCs/HFD comparado com BMDCs/SD favoreceu um efeito modesto de RES sob essas células e, conseqüentemente, na geração reduzida de células Treg durante o co-cultivo com células T CD4+. As células Tregs têm papel essencial na manutenção da homeostase e de redução da inflamação. Essas células podem atuar através de (i) citocinas inibitórias (IL-10, TGF- β 3 e IL-35) de células T efetoras (AKAMATSU et al., 2019; COLLISON et al., 2007; JOETHAM et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2000); (ii) pelo processo de citólise em linfócitos T efetores via granzima A/B e perforina (CAO et

al., 2007; KARRECI et al., 2017); (iii) pela disfunção metabólica via monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), assim como através da privação de IL-2 (CHINEN et al., 2016; KLEIN; BOPP, 2016); e (iv) inibindo a maturação e funções de DCs, via interação LAG3-MHC-II e CTLA-4-CD80/86 (CHEN et al., 2017; TUNG et al., 2018).

Em relação a SIRT1, poucos trabalhos relataram a modulação de Foxp3 por essa HDAC3. Porém, no mesmo período que foi observado a importância de SIRT1 em regular Foxp3 em modelos de autoimunidade e transplante (AKIMOVA et al., 2014; BEIER et al., 2011), foi descrito que SIRT1 tem a capacidade de desacetilar diretamente Foxp3, o que é favorecido pelas HDACs 6 e 9 e, conseqüentemente, causa o aumento do tempo de meia vida desse fator de transcrição e sua atividade, contrapondo com a inibição do NF- κ B por SIRT1 (BEIER et al., 2012; KWON et al., 2012).

Em outro estudo com DCs, o tratamento com EX-527 promoveu a redução de Treg Foxp3+ após co-cultivo com células T CD4+ de animais OT-II (LIU et al., 2015b). Após o *knockdown* de IL-12R β 2 e TGF- β R2 em animais OT-II, os autores perceberam que o efeito na expressão de *FoxP3* e de *Ifn γ* , anteriormente modulado nas células T CD4+ co-cultivadas por DCs sem atividade de SIRT1, fora perdido. Nesse mesmo estudo, de maneira complementar ao nosso estudo, foi demonstrado que BMDCs sem SIRT1 promoveram, durante o co-cultivo com células T CD4+, uma alta expressão de *Tbet* e baixa expressão de *Foxp3*. Sendo assim, esse mecanismo de sinalização parece corroborar fortemente com nossos resultados demonstrados até o presente momento.

Em modelo de melanoma, um dos processos que tornam as DCs tolerogênicas pelas células tumorais ocorre via Wnt/ β -catenina. As DCs reconhecem as quantidades de Wnt5a, que por sua vez ativa β -catenina, a qual promove a transcrição de IDO1 e PPAR- γ (ZHAO et al., 2018a), o que também foi observado por nós nas DCs tratadas com RES. O PPAR- γ estimula a oxidação de ácidos graxos (FAO) via modulação de carnitina palmitol transferase 1 alfa (CPT1 α) (ZHAO et al., 2018b). Esse aumento da respiração mitocondrial pelo estímulo de FAO ocasiona a inibição da produção das citocinas IL-12 e IL-6, o que segue na mesma direção dos nossos dados de metabolismo e da produção reduzida de IL-12p40 e IL-6 em DCs com alta atividade de SIRT1.

As DCs na presença de RES têm a glicólise diminuída, principalmente em BMDCs/SD. Em contrapartida, o tratamento com EX-527 aumentou a glicólise, mas principalmente em BMDC/HFD. Essa modulação da glicólise tem sido amplamente relacionada com o perfil pró-inflamatório de DCs (GUAK et al., 2018; THWE et al., 2017). Além disso, como o NF- κ B é dependente do metabolismo glicolítico, evidências têm demonstrado a conexão de SIRT1 com o metabolismo celular e as funções do NF- κ B (JEONG et al., 2011; KAUPPINEN et al., 2013; TORNATORE et al., 2012), o que pode ser inferido e transposto para as DCs.

Depois da realização de experimentos farmacológicos com um ativador e inibidor de SIRT1 em BMDCs, os experimentos *in vivo* demonstraram que cDCs do baço e de linfonodos de animais SIRT1 ^{Δ} estavam mais ativadas do que cDCs de animais SIRT1^{fl/fl}, em alguma extensão, corroborando os dados observados com o tratamento com agonista e antagonista de SIRT1 *in vitro*. De maneira mais

simplificada, um estudo anterior também demonstrou que a ausência de SIRT1 em DCs afeta o fenótipo e as funções dessas células. Neste trabalho, os autores infectaram animais com deleção condicional de *Sirt1* em DCs com um vírus sincicial respiratório (RSV). Os animais com a deleção específica de SIRT1 em DCs tiveram uma resposta pró-inflamatória mais eficaz ao RSV, além da geração de um maior número de células T memória com mais eficácia na resposta contra o RSV (ELESELA et al., 2020).

Em outro estudo, foi observado que a ausência de SIRT1 aumentou a eficiência do processo de autofagia e ativação das DCs, além de aumentar a polarização dos linfócitos T *helper* para o subtipo Th1, os quais produziam grandes quantidades de IFN- γ (OWCZARCZYK et al., 2015). Portanto, é sugestivo que SIRT1 possa ser extrapolada como um alvo independente dos efeitos da obesidade em DCs.

Na obesidade, diferente da abordagem de estudos anteriores envolvendo DCs e SIRT1 (ALVAREZ et al., 2012; WOO et al., 2016), nós conseguimos observar alguns efeitos aditivos e sinérgicos entre a deleção de SIRT1 em DCs e a obesidade, o que aumentou ainda mais o fenótipo pró-inflamatório em cDC1 e cDC2, efeito que, até então, não tinha sido observado. Interessantemente, esse efeito da deleção de SIRT1 na ativação de cDCs no baço e nos linfonodos foi semelhante aos resultados dos experimentos *in vitro*, ou seja, cDCs de animais SIRT1 Δ obesos, possuíam a maior expressão de MHC de classe II, CD86, e CD40 e IL-12p40, além da menor produção de TGF- β por cDCs, entre os demais grupos avaliados (SIRT1^{fl/fl}/SD, SIRT1^{fl/fl}/HFD e SIRT1 Δ /SD). Esses marcadores mencionados foram alterados em cDC2 de animais SIRT1 Δ /SD e SIRT1^{fl/fl}/HFD de maneira muito similar, tendo o efeito potencializado

a partir do momento em que os animais SIRT1^Δ adquiriram o perfil de obesidade. Por outro lado, as cDC1 somente manifestaram alterações na ativação celular quando a deleção de SIRT1 e o fator da obesidade estavam presentes. Portanto, isso caracteriza um efeito sinérgico da deleção de SIRT1 e da obesidade na modulação do fenótipo dessas células.

Ainda sobre as subpopulações de DCs, verificamos que a deleção de SIRT1 em DCs aumentou a porcentagem de cDC2 nos linfonodos, o que foi potencializada nos animais SIRT1^Δ obesos. Em contrapartida, somente após a deleção de SIRT1 e obesidade, nós conseguimos perceber o aumento da porcentagem de cDC1 nos linfonodos. Contrastando com as cDCs, observamos uma redução gradual das pDCs nos linfonodos após a deleção de SIRT1 seguida da obesidade.

Pouco tem sido estudado sobre as pDC na obesidade. As pDCs no tecido adiposo têm capacidade de auxiliar os macrófagos M1 no aumento da resistência à insulina através da secreção de interferon do tipo 1 (IFN1)(HANNIBAL et al., 2017). Visto que as BMDCs/SD e HFD não apresentarem alterações na expressão de IFN1 após o tratamento com RES e EX-527, optamos por não seguir em diante com novos experimentos sobre as pDCs e SIRT1, porém esses dados preliminares demonstram bons indícios.

É intrigante o fato da deleção SIRT1 em DCs (células CD11c+) promover maiores alterações no fenótipo de células cDC2 do que em células cDC1. A geração dessas células tem certa similaridade, pois ambas dividem progenitores em comum na sua ontogenia (progenitor de macrófagos e células dendríticas - MDP e progenitores comuns de células dendríticas - CDP), porém no final da diferenciação

dessas células ocorre a geração de progenitores pre-cDC1 e pre-cDC2 (GRAJALES-REYES et al., 2015; SCHLITZER et al., 2015).

Recentemente foi identificado que células B tratadas com NAD⁺ possuem a expressão aumentada de *Irf4*, o que foi correlacionado com a atividade de SIRT1 (GAN et al., 2020). Da mesma forma, tanto em pre-cDC2, quanto em cDC2 já diferenciadas, o fator de transcrição IRF4 atua como uma assinatura dessas células (BROWN et al., 2019). Portanto, podemos inferir que as cDC2 podem ser mais dependentes da ação de SIRT1 pelo fato de o IRF4 ter uma relação próxima com essa HDAC3, como foi reportado em células B.

Através da tecnologia de *single-cell transcriptome*, outras duas subdivisões de cDC2 foram descobertas: cDC2A, considerada anti-inflamatória e a cDC2B considerada pró-inflamatória. Interessantemente, a subdivisão cDC2B se dá principalmente através do fator de transcrição ROR γ T (BROWN et al., 2019), o qual já foi visto sendo regulado negativamente por SIRT1 via STAT3 em células T, impedindo a diferenciação em células Th17 (LIMAGNE et al., 2017). Sendo assim, cDC2B podem ser mais dependentes de SIRT1 por esse motivo também.

Por fim, os estudos anteriores com SIRT1 em DCs, somente demonstraram efeitos sob as funções de células T CD4⁺, (ALVAREZ et al., 2012; ELESELA et al., 2020; OWCZARCZYK et al., 2015; WOO et al., 2016; YANG et al., 2013), as quais são ativadas e induzidas a polarização principalmente por cDC2 (BROWN et al., 2019; EISENBARTH, 2019; SCHLITZER; GINHOUX, 2014). Todavia, recentemente as cDC1 também foram apontadas como potentes indutoras de células T CD4⁺ com ações antitumorais (FERRIS et al., 2020) e nós não focamos em experimentos usando o co-

cultivo entre células T CD8⁺ e DCs com SIRT1 alterada. Devido não estar nos objetivos do trabalho, também não elaboramos experimentos ex-vivo olhando diretamente para essas células, as quais são induzidas principalmente por células cDC1 (SCHLITZER et al., 2015). De toda maneira, nosso estudo aparenta ser pioneiro em avaliar a SIRT1 em subpopulações de DCs.

As BMDCs com atividade aumentada de SIRT1 favoreceram a proliferação de células Treg ao invés de células Th1. Nós observamos o efeito oposto no baço e linfonodos de animais SIRT1^Δ, o que foi potencializado na obesidade. No baço, a falta de SIRT1 em DCs provocou uma redução mais significativa de células Treg, quando comparado aos animais somente em dieta hiperlipídica. Além disso, a quantidade de Treg em animais SIRT1^Δ/SD foi equivalente à quantidade em SIRT1^Δ/HFD, o que demonstra o efeito independente da ausência de SIRT1 em DCs na diminuição porcentual de Tregs no baço.

Não foi possível verificar alterações significantes na IL-4 produzida por células T CD4⁺ pela deleção de SIRT1 e na obesidade, talvez pelo fato de que essa população celular já esteja diminuída na obesidade. Por outro lado, a produção de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ foi mais elevado nos baços de animais com deleção de SIRT1 magros e obesos. Sendo assim, pelo menos no baço, a obesidade não alterou a produção de IL-17 por células T CD4⁺. Nos linfonodos, a obesidade e a deleção de SIRT1 em DCs aumentaram a produção de IL-17 por células T CD4⁺. Estudos prévios já demonstraram o aumento de Th17 induzidos por DCs em indivíduo obeso (BERTOLA et al., 2012; ENDO et al., 2015). Devido ao fato de não percebermos um efeito sinérgico ou aditivo entre SIRT1 em DCs na geração de células Th17, não

continuamos avaliando esse eixo profundamente. Em acréscimo, essa correlação foi explorada anteriormente em um artigo que indica a modulação da SIRT1 no fator regulador de interferon 1 (IRF1) em DCs, o qual promove a transcrição de diversas moléculas que favorecem a polarização de Th17 em determinados microambientes (YANG et al., 2013).

Essa discrepância no efeito da deleção de SIRT1 em DCs no baço e nos linfonodos pode ser devido a heterogeneidade diferenciada de DCs nesses dois órgãos (BROWN et al., 2019). Estudos de caracterização demonstram que células cDC2 estão predominantemente nos linfonodos, as quais aparentemente estão sob maior efeito de SIRT1 segundo nossos dados. Além disso, essas células têm um grande potencial de gerar células Treg através de cDC2A, caracterizada por *single cell* RNAseq (BROWN et al., 2019). No entanto, avaliamos especificamente células Tregs Foxp3+. No baço, as células reguladoras do tipo Tr1 têm papel importante na manutenção da regulação da sistema imune periférico (GIANG; LA CAVA, 2017; HUANG et al., 2017), sendo que outro estudo utilizando a deleção de SIRT1 em DCs averiguou que SIRT1 tem importância na geração dessas células (YANG et al., 2013). Portanto, é necessário avaliar outros subtipos de células reguladoras além das Treg Foxp3+.

A expressão e a função da SIRT1 têm sido amplamente exploradas no tecido adiposo (CHALKIADAKI; GUARENTE; GUARENTE, 2012; NAWAZ et al., 2018; QIANG et al., 2012). Quando se tem uma alta disponibilidade de nutrientes como na obesidade, a SIRT1 é inativada no WAT, promovendo acetilação de PPAR γ , que favorece o estoque de lipídeos. Na direção oposta, em indivíduos saudáveis ou na

condição de restrição calórica, a SIRT1 torna-se ativa no WAT, recrutando as atividades de PPAR γ através da desacetilação dos resíduos de lisina Lys268 e Lys293, que por fim, resulta na estabilidade da tolerância à insulina (QIANG et al., 2012).

No mesmo ano de 2012, foi demonstrado que a SIRT1 está menos ativa no WAT de animais obesos. Essa inatividade de SIRT1 em adipócitos de animais obesos foi associada a clivagem dessa HDAC por caspase-1, providenciando uma conexão entre o estresse inflamatório e a disfunção metabólica (CHALKIADAKI; GUARENTE; GUARENTE, 2012).

Mais recentemente, a SIRT1 foi demonstrada ser um repressor essencial da adipogênese através da desacetilação de β -catenina, promovendo seu acúmulo no núcleo e, conseqüentemente, induzindo a transcrição de genes que bloqueiam a adipogênese em células-tronco mesenquimais (MSCs)(ZHOU et al., 2016).

A SIRT1 e as demais sirtuínas foram caracterizadas como HDACs que agem diretamente nos resíduos de lisina das histonas do tipo 3 e 4, ou seja, em regiões diversas da heterocromatina pelo fato dessas duas histonas formarem boa parte dos nucleossomos das cromátides (GUARENTE, 2012; HOUTKOOPEL; PIRINEN; AUWERX, 2012). Porém, diversos estudos já têm demonstrado interações de SIRT1 diretamente com proteínas ou fatores de transcrição, através de grupos acetil em sua estrutura (JUNG et al., 2020; LIMAGNE et al., 2017; YANG et al., 2016). É interessante observar que não somente SIRT1 atua reprimindo e ativando diferentes moléculas, mas essas mesmas moléculas-alvo regulam SIRT1, como no caso dos fatores de transcrição FOXO1 e CREB, por exemplo (FRESCAS; VALENTI;

ACCILI, 2005; NORIEGA et al., 2011). Esse mesmo tipo de *feedback* bidirecional já foi reportado em relação a via de Wnt/ β -catenina e de diferentes PPARs. Além disso, ambas as moléculas são reguladas por fatores que estão desregulados na obesidade, como os níveis de glucose, coenzimas e cofatores em diferentes tecidos (CHOCARRO-CALVO et al., 2013; WANG; QIANG; FARMER, 2008).

Como dito anteriormente, DCS podem contribuir, independentemente de outras células, com a sensibilidade à insulina no tecido adiposo e sistemicamente. Esse controle ocorre principalmente através da ativação de β -catenina por cDC1 e de PPAR γ por cDC2 (MACDOUGALL et al., 2018). Sabendo disso e que SIRT1 regula esses dois elementos em outras células diretamente relacionados com AT (QIANG et al., 2012; ZHOU et al., 2016), tentamos verificar se DCs sem SIRT1 no tecido adiposo estão relacionadas com a disfunção metabólica na obesidade. Os animais SIRT1^A em HFD possuem maior quantidade massa corporal, menor tolerância à glucose e resistência à insulina. Interessantemente, somente a deleção de SIRT1 em DCs, sem a obesidade estar presente, ocasionou em uma maior resistência à insulina. Estudos prévios já demonstram um perfil de disfunção metabólica similar do que foi visto nesse trabalho, no entanto, a deleção de SIRT1 era em células mieloides (KIM et al., 2015) e adipócitos (HUI et al., 2017). Desta forma, este trabalho adiciona uma nova informação, na qual a deleção apenas em DC seja suficiente para agravar os efeitos gerados pela obesidade na homeostase da glicose.

Tanto β -catenina nas cDC1 quanto PPAR- γ em cDC2 foram reduzidas pela deleção de SIRT1 e pelo perfil de obesidade. Segundo Macdougall et al., a β -catenina, ao migrar para o núcleo das cDC1, promove a transcrição de grandes quantidades

de IL-10 no WAT, que favorece a manutenção da porcentagem de Tregs no WAT e o controle da expansão dos adipócitos. Por outro lado, o PPAR- γ forma um heterodímero com o receptor retinóico X (RXR) e regula a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, da glicólise e da inflamação (*Ucp2*, *Ho1*, *Cd36*, *iNos*, *Lxra*, etc.), como revisado anteriormente por Ahmadian e colaboradores (AHMADIAN et al., 2013). A falta de SIRT1 nas cDC2 agrava ainda mais a redução de PPAR- γ causado pela obesidade, o que favorece a inflamação e hiperplasia do tecido adiposo. Isso possivelmente acontece pela redução de um mecanismo chamado transrepressão, que ocorre sob os fatores de transcrição como o NF- κ B e AP-1. Esse fenômeno ocorre impedindo a liberação do complexo repressor localizado no promotor desses fatores de transcrição (GLASS; OGAWA, 2006).

A SIRT1 é uma peça-chave no metabolismo celular em diversos tipos de tecidos (CHAO et al., 2017; CHOI et al., 2019; NIKSERESHT; KHODAGHOLI; AHMADIANI, 2019; YEUNG et al., 2004) e o metabolismo influencia diretamente no fenótipo das DCs (CORTESE; SINCLAIR; PULENDRAN, 2014; GÓMEZ-CABAÑAS et al., 2019; MONDANELLI et al., 2017; XU et al., 2017). Ao realizar os ensaios de *Mito* e *Glycolitic Stress Assay*, observamos que as BMDCs/HFD possuíam um aumento tanto da OXPHOS (OCR) quanto da glicólise (ECAR) em relação as BMDCs/SD. Ao aumentar a quantidade e atividade SIRT1 por RES, foi notado um aumento ainda maior do OCR e uma diminuição do ECAR. Como visto nos nossos experimentos, o tratamento com RES tem sido aplicado com importante composto fenólico para o estimular a biogênese mitocondrial, modulando a massa mitocondrial e $\Delta\Psi_m$, principalmente através do aumento de PGC1- α , NRF-1/2 e AMPK, os quais estão

ligados estritamente com SIRT1 (PRICE et al., 2012), o que pode ter relação com as alterações em $\Delta\Psi_m$ observados nesse trabalho.

As DCs são dependentes do $\Delta\Psi_m$ para realizar suas funções como APC. As DCs de indivíduos idosos têm a capacidade reduzida de apresentação antigênica (AGRAWAL et al., 2007; SCHMITT & SEGERT, 2008), o que foi recentemente conectado com o metabolismo mitocondrial. Neste estudo, foi observado que as DCs de camundongos idosos possuíam menor $\Delta\Psi_m$, menor OCR e diminuição da produção de ATP contrastando com a diminuição de ROS (CHOUGNET et al., 2015). Interessante notar que essas alterações também foram causadas em nosso modelo durante a inibição de SIRT1. Esses efeitos podem ser conectados, pois a diminuição da respiração mitocondrial (OCR) e, por consequência, a redução da produção de ATP pode ser proveniente da cadeia transportadora de elétrons deficiente dessas DCs, que são afetadas pela redução da OXPHOS, que por sua vez disponibiliza uma quantidade importante de NAD⁺ para complexo I da cadeia transportadora de elétrons (DE VADDER et al., 2016; GÖKHAN S. HOTAMISLIG, 2006; STONE; DARLINGTON, 2002). Perante essa problemática, SIRT1 pode ser relacionada pelo fato de ser um importante alvo em estudos com envelhecimento (AGRAWAL et al., 2007; AVALOS; BOEKE; WOLBERGER, 2004; KOZAKO et al., 2015) e pela sua dependência de NAD⁺, a qual tem um déficit nesse sistema.

Apesar de não termos avaliado as funções de AMPK no projeto até o momento, fortes indícios favorecem a ligação do eixo SIRT1-AMPK em DCS na obesidade. Estudos recentes demonstraram que a AMPK promove a reciclagem de CD36 (SAMOVSKI et al., 2012, 2015), favorecendo sua presença na superfície celular,

que por sua vez, promove a captura de lipídeos, acaba incrementando a respiração mitocondrial (O'NEILL; HOLLOWAY; STEINBERG, 2013). Na direção oposta, AMPK pode inibir a enzima acetil-CoA carboxilase, que converte acetil-CoA em malonil-CoA, afetando diretamente a β -oxidação nas células do parênquima (O'NEILL; HOLLOWAY; STEINBERG, 2013; PARK et al., 2002). No entanto, essa restauração de AMPK pode trazer benefícios em prol da normalização da disfunção metabólica (COOL et al., 2006; POLLARD et al., 2019). Portanto, outros elementos possivelmente ainda não relacionados, devem estar envolvidos no metabolismo de DCs de animais obesos para manter o OCR mais alto do que em DCs de animais magros, assim como já foi visto em macrófagos (SERBULEA et al., 2018). Além disso, a SIRT1 é caracterizada como um regulador central de vários moduladores metabólicos, podendo influenciar outros elementos além de AMPK. A SIRT1 também regula PPAR- γ que também aumenta a presença de CD36 na superfície celular (AHMADIAN et al., 2013; LUO et al., 2015). Todavia, ao contrário do que alguns estudos demonstraram sobre a AMPK (O'NEILL; HOLLOWAY; STEINBERG, 2013; PARK et al., 2002), o PPAR- γ estimula a β -oxidação, o que está negativamente regulado durante a obesidade, especialmente no tecido adiposo (AHMADIAN et al., 2013). Portanto, quando a expressão e atividade de SIRT1 é aumentada em DCs de animais obesos, além da grande quantidade da captura de lipídeos e da β -oxidação ocorrendo devido à ausência de AMPK, a maior atividade PPAR- γ , através da maior atividade de SIRT1, aumenta ainda mais esse processo de lipólise, o que pode justificar o OCR mais elevado em BMDCs/HFD. Em contrapartida, o ECAR foi reduzido após o estímulo de SIRT1 e aumentado após a inibição dessa HDAC3 em DCs. Simultaneamente com o aumento do ECAR após inibição de SIRT1, verificamos

o aumento de Glut1 nas DCs derivadas dos animais obesos e um aumento do *uptake* de glicose, além da quantidade elevada de lactato no sobrenadante de ambos os tipos de DCs (BMDCs/SD e HFD tratados com EX-527). Interessantemente, a ubiquitina ligase 1 tem atividade aumentada na presença de altos níveis de glicose, a qual medeia a degradação da subunidade $\alpha 2$ da AMPK (LEE et al., 2013). Concentrações elevadas de glicose intracelular induzem o acúmulo de diacilglicerol (DAG), um ativador de proteínas quinases C (PKC), que induz a fosforilação inibitória de S485/491 da subunidade α da AMPK (HAMDULAY et al., 2014). Portanto, a alta captação de glicose e a redução de AMPK podem estar relacionadas com o perfil do OCR observado anteriormente nas mesmas células.

Um dos principais questionamentos do projeto foi como a obesidade afetava a atividade de SIRT1 em DCs. Para investigar isso verificamos uma das principais vias catabólicas para geração de NAD⁺, a via do catabolismo do triptofano. Recentemente, foi demonstrado que a via do triptofano tem papel fundamental no desenvolvimento do perfil tolerogênico em DCs (MONDANELLI et al., 2017; ZHAO et al., 2018a). Em macrófagos, a síntese de NAD⁺ pela via do triptofano impulsiona atividade de SIRT3 (também dependente de NAD⁺) para que a resposta inflamatória dos macrófagos seja reduzida, especialmente envolvendo as inflamações associadas ao envelhecimento (MINHAS et al., 2019). Identificamos poucas alterações na via do triptofano no sobrenadante das BMDCs/SD e BMDCs/HFD. No entanto, encontramos quantidades inversamente proporcionais de triptofano e quinurenina no sobrenadante dessas células, sendo que BMDCs/SD possuem maiores quantidades de quinurenina no sobrenadante do que BMDCs/HFD. Na outra direção, o triptofano estava presente em maiores quantidade no sobrenadante das

BMDCs/HFD quando comparado às BMDCs/SD. O tratamento com RES aumentou a quantidade de quinurenina e diminuiu o triptofano disponível no sobrenadante dessas BMDCs/SD e BMDCs/HFD. Opostamente, EX-527 diminuiu a quantidade de quinurenina e aumentou o triptofano disponível no sobrenadante. Seguindo esses dados, há indícios que essa regulação entre triptofano e quinurenina, pode ser realizada por SIRT1. Um ponto interessante a ser notado é o fato de que a quinurenina no microambiente, principalmente produzida por DCs, pode conduzir a geração de células Treg Foxp3+ (LI et al., 2016; ZHAO et al., 2018a). A quinurenina vem sendo descrita como um dos principais ligantes do receptor aril-hidrocarboneto (AhR), o qual está expresso em diversas células mieloides, principalmente, as células T (CAMPESATO et al., 2020; QUINTANA et al., 2008). A ligação de quinurenina ao AhR reduz o metabolismo glicolítico por bloquear HIF-1 α , além de estimular a transcrição de *Foxp3*, favorecendo um microambiente anti-inflamatório (QUINTANA et al., 2008; ROTHHAMMER; QUINTANA, 2019).

Outro ponto interessante encontrado foi a quantidade aumentada de ácido quinoliníco (QA), conforme a atividade de SIRT1 foi reduzida por EX-527 e pela obesidade. O QA solúvel e o acumulado dentro das células têm efeitos tóxicos, causando o aumento da espécie reativas de oxigênio e nitrogênio, principalmente pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial (FERREIRA et al., 2018), o que também foi visto nas BMDCs com atividade reduzida de SIRT1 neste trabalho.

Na porção proteica intracelular das BMDCs foi encontrado uma redução dos níveis do triptofano nas células que foram tratadas com RES, principalmente nas BMDCs/SD. Em contrapartida, o tratamento com EX-527 teve efeito oposto,

aumentando a quantidade de triptofano, principalmente nas BMDCs/HFD. Paralelo a isso, observamos o aumento da expressão e produção de IDO1 conforme SIRT1 estivesse mais presente ou mais ativa em BMDCs, ou seja, em BMDCs provenientes de animais magros e tratadas com RES. Além disso, notamos o aumento da enzima QPRT, que também foi descrito como um importante componente para estimular o OCR em macrófagos (MINHAS et al., 2019). Sendo assim, este mesmo estudo com macrófagos concluiu que a redução dessa respiração mitocondrial pela falta de fosforibosiltransferase de quinolinato (QPRT) conduziu a falta de NAD⁺ e o desenvolvimento do perfil pró-inflamatório dos macrófagos derivados da medula.

O bloqueio da síntese *de novo* de NAD⁺ causa acúmulo dos intermediários pró-inflamatórios do ciclo TCA, como succinato e malato (KEIRAN et al., 2019; MILLS et al., 2016). O acúmulo desses intermediários aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, além de suprimir a produção de TGF- β e IL-10, que é gerado por meio da inibição dos domínios da prolil-hidroxilase responsáveis pela regulação HIF-1 α , um ativador transcricional de citocinas pró-inflamatórias canônicas (MINHAS et al., 2019; TANNAHILL et al., 2013).

Após nossas conclusões prévias dos experimentos *in vitro*, outros resultados demonstraram uma redução de IDO1 nos órgãos secundários e no VAT dos animais obesos, potencializado com a deleção de SIRT1 em DCs. Para avaliar o potencial translacional dos nossos achados experimentais, verificamos o banco de dados de um estudo prévio realizados em humanos. Nesse estudo, nove pacientes obesos foram tratados com RES por 30 dias e outros nove foram tratados com placebo (KONINGS et al., 2014). Quando avaliamos os dados de transcriptoma do AT desses

pacientes percebemos um aumento significativo de IDO1 nos pacientes tratados com RES. Complementar a isso, os genes mais diferencialmente expressos entre os grupos estavam relacionados com a via *de novo* de NAD⁺, reorganização da heterocromatina e processos de desacetilação, o que podem indicar um eixo SIRT1-IDO1 ativo também em humanos, até então não foi demonstrado.

Para reforçar nossa hipótese e conclusões, o tratamento com RES e EX-527 em BMDCs/SD e BMDCs/HFD de animais IDO KO não tiveram efeito sob o fenótipo das DCs. Portanto, os dados gerados até então, suportam interações entre SIRT1 e IDO1, o que influencia a manutenção do fenótipo tolerogênico em DCs.

De fato, é necessário esclarecer como a interação de SIRT1 e IDO1 ocorre, se a modulação da heterocromatina ou interações proteína-proteína predomina nesse novo eixo. Experimentos elaborados por nós estão sendo feitos e repetidos para esclarecer essa questão.

A obesidade tem contribuição importante em diversos tipos de doenças e desordens metabólicas acopladas a inflamação (ÇAKMUR, 2017; MILLER; SPENCER, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A rejeição de um enxerto sólido após um transplante é agravada através da obesidade, especialmente pela inflamação basal crônica que as células imunes (como as DCs), responsáveis pelo processo de rejeição, sofrem durante a hiperplasia do tecido adiposo e a desregulação metabólica (KARRECI et al., 2017; LEDERER et al., 2008; MORAES-VIEIRA; SILVA; TAKENAKA, 2010).

Devido à importância das DCs tanto no fenótipo da obesidade, quanto na resposta imunológica da rejeição (HARPER et al., 2015; JAISWAL et al., 2020;

MACDOUGALL et al., 2018) e seguindo os objetivos iniciais do trabalho, também realizamos o modelo de transplante de pele nos animais SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ, magros e obesos, para avaliar um possível efeito sinérgico ou aditivo entre a obesidade e a deleção de SIRT1 em DCs. No entanto, não identificamos uma diferença significativa entre os grupos SIRT1^{fl/fl} e SIRT1^Δ. Somente foi observado uma diferença entre os animais que estavam em dieta padrão e hiperlipídica. Somente uma repetição foi feita avaliando a rejeição do transplante de pele e, cada grupo tinha 3 animais, o número mínimo para construir um análise estatística neste tipo de estudo (CHARAN; KANTHARIA, 2013). Portanto, para chegar a uma conclusão mais robusta, é necessário realizar mais repetições experimentais, avaliando os diferentes *times points* após o transplante.

Em resumo, a SIRT1 tem papel central no controle do metabolismo e do fenótipo de DCs. Está claro que a obesidade afeta diretamente a presença e atividade de SIRT1, principalmente através de um déficit no catabolismo do triptofano, o qual é responsável pela via *de novo* de NAD⁺. Essa coenzima é essencial para o funcionamento de SIRT1, a qual também modula a disponibilidade de NAD⁺ pelo aumento da expressão de IDO1, enzima fundamental na via da síntese catabólica dessa coenzima.

6. CONCLUSÃO

A SIRT1 é peça central no metabolismo de diversos tipos celulares em diferentes contextos da resposta imune. Neste trabalho, podemos concluir que:

- a. A obesidade diminui a expressão de SIRT1 em DCs de órgãos linfoides secundários e no VAT. Além disso, observamos a redução da atividade de SIRT1 em BMDCs derivados de animais obesos;
- b. A SIRT1 favorece um fenótipo tolerogênico em DCs através da redução de MHC-II, coestimuladores e produção de citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-12p40), além do aumento da produção de TGF- β ;
- c. Vinculado com a mudança de fenótipo nas DCs, conseguimos perceber uma reprogramação metabólica em DCs via SIRT1, o que favorece o aumento da OXPHOS ao invés da glicólise, principalmente através da regulação negativa de *Glut1* e pela regulação positiva da proteína CD36, o que por sua vez leva ao aumento de massa mitocondrial e menor $\Delta\Psi_m$, o que é característico de uma DC tolerogênica;
- d. A priori, as quantidades reduzidas de NAD⁺ pela via da quinurenina em animais obesos afeta diretamente atividade de SIRT1, pelo fato dessa HDAC ser dependente dessa coenzima. Uma das principais enzimas para geração de quinurenina, IDO1, parece ser regulada por SIRT1, o que causa a redução de quinurenina secretada pelas DCs, interferindo na geração de células Treg em órgãos linfoides secundários, no VAT e *in vitro*;
- e. A deleção de SIRT1 em DCs de animais obesos promoveu menor tolerância a glicose e maior resistência a insulina, quando comparado com aqueles que

possuem SIRT1 em DCs. Com descrito em outro estudo, verificamos que a obesidade diminuíu β -catenina em cDC1 e PPAR- γ em cDC2. Além disso, a deleção de SIRT1 agravou a redução β -catenina e PPAR- γ em cDCs durante a obesidade, o que não foi descrito em outros estudos até o momento.

- f. Como já demonstrados em estudos anteriores, animais obesos transplantados apresentaram uma rejeição antecipada do enxerto em relação aos animais magros. Porém, a ausência de SIRT1 em DCs não acelerou o processo de rejeição. Todavia, é importante ressaltar que o experimento foi repetido uma única vez e com três animais por grupo, devido especialmente ao atraso na expansão da colônia de animais durante a pandemia de COVID-19, a qual limitou nossos espaços em biotérios.

É necessário investigar mais afundo novos alvos de SIRT1 e moléculas regulem essas HDAC3 de maneira endógena ou exógena, pois HDAC3 governam a resposta imunológica de diferentes formas, como tem sido demonstrado em estudos anteriores e aqui. Por fim, SIRT1 pode oferecer um lado translacional para estudos clínicos em pacientes obesos, sendo que um dos caminhos pode ser através da regulação da sensibilidade da glicose sistêmica e do metabolismo da biossíntese de NAD⁺ em DCs.

7. REFERÊNCIAS

ABESO. **Associação Brasileira para Estudos de Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO)**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade#>>.

ABT, M. C. et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 158–170, 2012.

ABUL K ABBAS; ANDREW H LICHTMAN; SHIV PILLAI. **Cellular and molecular immunology**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.

ADLER, B. J.; KAUSHANSKY, K.; RUBIN, C. T. Obesity-driven disruption of haematopoiesis and the bone marrow niche. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 737–748, 2014.

AGRAWAL, A. et al. Altered Innate Immune Functioning of Dendritic Cells in Elderly Humans: A Role of Phosphoinositide 3-Kinase-Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6912–6922, 2007.

AHMADIAN, M. et al. Ppar γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future. **Nature Medicine**, v. 19, n. 5, p. 557–566, 2013.

AKAMATSU, M. et al. Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. **Science Immunology**, v. 4, n. 40, p. 1–17, 2019.

AKIMOVA, T. et al. Targeting sirtuin-1 alleviates experimental autoimmune colitis by induction of Foxp3 + T-regulatory cells. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1209–

1220, 2014.

ALVAREZ, Y. et al. Sirtuin 1 is a key regulator of the interleukin-12 p70/interleukin-23 balance in human dendritic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35689–35701, 2012.

AMANO, S. U. et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 162–171, 2014.

ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S.; MORAES-VIEIRA, P. M. Adipokines as Drug Targets in Diabetes and Underlying Disturbances. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, n. Figure 1, p. 1–11, 2015.

ARMSTRONG, K. A. et al. Impact of obesity on renal transplant outcomes. n. i, p. 405–413, 2005.

ATKINSON, L.; MOLITCH, E.; DAHMS, T. Use of anthropometric weight loss ≥ 3 to assess. **Analysis**, n. June, p. 769–773, 2018.

AVALOS, J. L.; BOEKE, J. D.; WOLBERGER, C. Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes. **Molecular Cell**, v. 13, n. 5, p. 639–648, 2004.

AYARI, A. et al. Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, 2020.

AYNE, W. I. D. P.; ATAS, A. R. J. M. Are wound complications after a kidney transplant more common with modern immunosuppression? v. 72, n. 12, p. 1920–1923, 2013.

BADAWY, A. A. B. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 10, n. 1, 2017.

BAUR, A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337–342, 2006.

BEIER, U. H. et al. Sirtuin-1 Targeting Promotes Foxp3+ T-Regulatory Cell Function and Prolongs Allograft Survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 5, p. 1022–1029, 2011.

BEIER, U. H. et al. Histone deacetylases 6 and 9 and sirtuin-1 control Foxp3+ regulatory T cell function through shared and isoform-specific mechanisms. **Science Signaling**, v. 5, n. 229, p. 1–10, 2012.

BENADOR, I. Y. et al. Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 869- 885.e6, 2018.

BERTOLA, A. et al. Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. **Diabetes**, v. 5, n. 24, p. 2238–2247, 2012.

BILWANI, F. A.; KNIGHT, K. L. Adipocyte-Derived Soluble Factor(s) Inhibits Early Stages of B Lymphopoiesis. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4379–4386, 2012.

BOOTH, D. R. et al. Cistronic and genetic evidence that the Vitamin D receptor

mediates susceptibility to latitude-dependent autoimmune diseases. **Genes and Immunity**, v. 17, n. 4, p. 213–219, 2016.

BOUTAYEB A, M. AND M. S. Obesity and liver transplantation. **Clinics in Surgery**, v. 2, n. December 2013, p. 1–5, 2017.

BRACHMANN, C. B. et al. The SIR2 gene family , conserved silencing , cell cycle progression , and chromosome stability. **Genes & Development**, v. 9, p. 2888, 1995.

BROGDON, J. L. et al. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1123–1130, 2007.

BROWN, C. C. et al. Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. **Cell**, v. 179, n. 4, p. 846- 863.e24, 2019.

BRUNO GHIROTTI, FERNANDA FERNANDES TERRA, NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA, P. J. B. Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

ÇAKMUR, H. Obesity as a Growing Public Health Problem. **Adiposity - Epidemiology and Treatment Modalities**, 2017.

CAMPESATO, L. F. et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD + metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1056–1060, 2009.

CANTÓ, C.; MENZIES, K. J.; AUWERX, J. NAD⁺ Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 31–53, 2015.

CAO, X. et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 635–646, 2007.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L.; GUARENTE, L. Article High-Fat Diet Triggers Inflammation-Induced Cleavage of SIRT1 in Adipose Tissue To Promote Metabolic Dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 180–188, 2012.

CHANG, H. C.; GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 138–145, 2014.

CHANG, M. Obesity and Cancer Risk: Recent Review and Evidence Karen NIH Public Access. **Curr Oncol Rep.**, v. 13, n. 1, p. 71–76, 2013.

CHAO, S. C. et al. Induction of sirtuin-1 signaling by resveratrol induces human chondrosarcoma cell apoptosis and exhibits antitumor activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303–306, 2013.

CHEN, L.; YANG, L. Regulation of circRNA biogenesis. n. April, p. 381–388, 2015.

CHEN, X. et al. Tumor-derived CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4. **Pathology Research and Practice**, v. 213, n. 3, p. 245–249, 2017.

CHINEN, T. et al. An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function. **Nature Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1322–1333, 2016.

CHO, K. W. et al. Adipose Tissue Dendritic Cells Are Independent Contributors to Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. September, p. 3650–3661, 2016a.

CHO, K. W. et al. Adipose Tissue Dendritic Cells Are Independent Contributors to Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 9, p. 3650–3661, 2016b.

CHOCARRO-CALVO, A. et al. Glucose-Induced β -Catenin Acetylation Enhances Wnt Signaling in Cancer. **Molecular Cell**, v. 49, n. 3, p. 474–486, 2013.

CHOI, I. et al. SIRT1 in Astrocytes Regulates Glucose Metabolism and Reproductive Function. **Endocrinology**, v. 160, n. March, p. 1547–1560, 2019.

CHOUGNET, C. A. et al. Loss of Phagocytic and Antigen Cross-Presenting Capacity in Aging Dendritic Cells Is Associated with Mitochondrial Dysfunction. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2624–2632, 2015.

CIARLO, E. et al. Sirtuin 3 deficiency does not alter host defenses against bacterial and fungal infections. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

COLLINS, N. et al. The Bone Marrow Protects and Optimizes Immunological Memory during Dietary Restriction. **Cell**, v. 178, n. 5, p. 1088–1101.e15, 2019.

COLLISON, L. W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 566–569, 2007.

COOL, B. et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome.

Cell Metabolism, v. 3, n. 6, p. 403–416, 2006.

CORTESE, M.; SINCLAIR, C.; PULENDRAN, B. Translating glycolytic metabolism to innate immunity in dendritic cells. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 737–739, 2014.

CORTEZ, M. et al. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ b and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 379–386, 2013.

COUNCIL OF EUROPE; IBEROAMERICAN NETWORK/COUNCIL; WORLDWIDE NETWORK FOR BLOOD & MARROW TRANSPLANTATION (WBMT); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES (ONT). **GODT: Global Organization on Donation and Transplantation.**

CUI, X. et al. Inactivation of Sirt1 in mouse livers protects against endotoxemic liver injury by acetylating and activating NF- κ B. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2016.

D., W. et al. Resveratrol, a sirtuin 1 activator, increases IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with knee osteoarthritis. **Clinical Epigenetics**, v. 5, n. 1, p. 10, 2013.

DAENTHANASANMAK, A. et al. Targeting Sirt-1 controls GVHD by inhibiting T-cell allo-response and promoting Treg stability in mice. **Blood**, v. 133, n. 3, p. 266–279, 2019.

DAUSSET, P. J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haematol**, v. 166, n. May, p. 156–166, 1958.

DE GREGORIO, E. et al. Relevance of SIRT1-NF- κ B axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1–24, 2020.

DE VADDER, F. et al. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 151–157, 2016.

DENG, T. et al. Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. March, p. 411–422, 2013.

DHORNE-POLLET, S. et al. The miRNA-targeted transcriptome of porcine alveolar macrophages upon infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. n. June 2017, p. 1–15, 2019.

DICK, A. S. et al. Liver Transplantation at the Extremes of the. p. 968–977, 2009.

DING, L.; MORRISON, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 231–235, 2013.

DONG, L. et al. Crucial role of histone deacetylase SIRT1 in myeloid-derived suppressor cell-mediated reprogramming of CD4⁺ T-cell differentiation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 7, p. 785–787, 2020.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 2, p. 89–103, 2019.

ELESELA, S. et al. Sirtuin 1 regulates mitochondrial function and immune homeostasis in respiratory syncytial virus infected dendritic cells. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. 1–22, 2020.

ELKHAL, A. et al. NAD⁺ regulates Treg cell fate and promotes allograft survival via a systemic IL-10 production that is CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2016.

ENDO, Y. et al. Obesity drives Th17 cell differentiation by inducing the lipid metabolic kinase, ACC1. **Cell Reports**, v. 12, n. 6, p. 1042–1055, 2015.

EVANS, J. et al. LC/MS analysis of NAD biosynthesis using stable isotope pyridine precursors. **Analytical Biochemistry**, v. 306, n. 2, p. 197–203, 2002.

FERREIRA, F. S. et al. Kynurenic Acid Restores Nrf2 Levels and Prevents Quinolinic Acid-Induced Toxicity in Rat Striatal Slices. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 8538–8549, 2018.

FERRIS, S. T. et al. cDC1 prime and are licensed by CD4⁺ T cells to induce anti-tumour immunity. **Nature**, v. 584, n. 7822, p. 624–629, 2020.

FRESCAS, D.; VALENTI, L.; ACCILI, D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20589–20595, 2005.

FRIEDMAN, J. M. A war on obesity, not the obese. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 856–858, 2003.

FRYE, R. A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2

gene: Sir2-like proteins (Sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, n. 1, p. 273–279, 1999.

FUJIMOTO, A. I. AND D. Enzymatic deacetylation of histone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 36, n. 1, p. 32 ، ص 117, 1969.

GAN, H. et al. B cell Sirt1 deacetylates histone and non-histone proteins for epigenetic modulation of AID expression and the antibody response. **Science Advances**, v. 6, n. 14, p. 1–18, 2020.

GANESAN, R. et al. Salmonella Typhimurium disrupts Sirt1/AMPK checkpoint control of mTOR to impair autophagy. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–22, 2017.

GARCÍA NORES, G. D. et al. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 10, p. 1582–1590, 2016.

GERTZ, M. et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 30, p. 2772–2781, 2013.

GHISAYS, F. et al. The N-Terminal Domain of SIRT1 Is a Positive Regulator of Endogenous SIRT1-Dependent Deacetylation and Transcriptional Outputs. **Cell Reports**, v. 10, n. 10, p. 1665–1673, 2015.

GHOSH, A. R. et al. Adipose recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells fuel metaflammation. **Diabetes**, v. 65, n. 11, p. 3440–3452, 2016.

GIANG, S.; LA CAVA, A. IRF1 and BATF: Key drivers of type 1 regulatory T-cell

differentiation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 14, n. 8, p. 652–654, 2017.

GIBSON, P. R. The intracellular target of butyrate's actions: HDAC or HDON'T? **Gut**, v. 46, n. 4, p. 447–448, 2000.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44–55, 2006.

GO, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 2, n. November, p. 10–13, 2002.

GÖKHAN S. HOTAMISLIG. Inflammation and metabolic disorder. **Nature, insight Review**, v. 444, n. 10.1038/nature05485, p. 860–867, 2006.

GÓMEZ-CABAÑAS, L. et al. Immunological Synapse Formation Induces Mitochondrial Clustering and Mitophagy in Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 6, p. 1715–1723, 2019.

GRAJALES-REYES, G. E. et al. Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α + conventional DC clonogenic progenitor. **Nature Immunology**, v. 16, n. 7, p. 708–717, 2015.

GUAK, H. et al. Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

GUARENTE, L. et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 795–800, 2000.

GUARENTE, L. Sirtuins And Calorie Restriction. **Nature Reviews Molecular Cell**

Biology, v. 13, n. February, p. 4288, 2012.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 32–42, 2009.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. July, p. 2715–2729, 2004.

HAMDULAY, S. S. et al. Synergistic Therapeutic Vascular Cytoprotection against Complement-Mediated Injury Induced via a PKC α -, AMPK-, and CREB-Dependent Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 9, p. 4316–4327, 2014.

HANNIBAL, T. D. et al. Deficiency in plasmacytoid dendritic cells and type I interferon signalling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2033–2041, 2017.

HARPER, S. J. F. et al. CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. **PNAS**, v. 112, n. 41, p. 12788–12793, 2015.

HARRISON, G. G.; PH, D. Height-Weight Tables. n. 9, 2016.

HERRANZ, D. et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. **Nature Communications**, v. 1001, n. April, p. 1–8, 2010.

HODA BADR, CINDY L. CARMACK, DEBORAH A. KASHY, MASSIMO CRISTOFANILLI, AND T. A. R. Role of Fatty-acid Synthesis in Dendritic Cell Generation and Function. **The Journal of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

HORVATH, S.; RAJ, K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. **Nature Reviews Genetics**, 2018.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor - α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. **Science**, v. 259, n. January, p. 87–92, 1993.

HOUTKOOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature Molecular Cell Biology**, v. 13, n. April, p. 225–238, 2012.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191–196, 2003.

HU, F. B. et al. Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women. **Diabetes**, v. 53, n. March, p. 693–700, 2000.

HUANG, W. et al. ITK signalling via the Ras/IRF4 pathway regulates the development and function of Tr1 cells. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–15, 2017.

HUI, X. et al. Adipocyte SIRT 1 controls systemic insulin sensitivity by modulating macrophages in adipose tissue. **EMBO reports**, v. 18, n. 4, p. 645–657, 2017.

JAISSWAL, A. K. et al. Dendritic Cell-Restricted Progenitors Contribute to Obesity-Associated Airway Inflammation via Adam17-p38 MAPK-Dependent Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–15, 2020.

JEONG, I. K. et al. Inhibition of NF- κ B prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, n. 12, p. 684–692, 2011.

JIMENEZ-GOMEZ, Y. et al. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduce the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 533–545, 2013.

JOETHAM, A. et al. Naturally Occurring Lung CD4 + CD25 + T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF- β . **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1433–1442, 2007.

JOGL, G.; TONG, L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. **Cell**, v. 112, n. 1, p. 113–122, 2003.

JUNG, T. et al. Deacetylation by SIRT1 promotes the tumor- suppressive activity of HINT1 by enhancing its binding capacity for β -catenin or MITF in colon cancer and melanoma cells. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 12276, n. May, p. 1–15, 2020.

KANG, H. et al. Astaxanthin inhibits alcohol-induced inflammation and oxidative stress in macrophages in a sirtuin 1-dependent manner. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 85, n. 2, p. 1–9, 2020.

KAPLAN, N. et al. The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 362–366, 2009.

KARRECI, E. S. et al. Human regulatory T cells undergo self-inflicted damage via granzyme pathways upon activation. **JCI Insight**, v. 2, n. 21, p. 1–14, 2017.

KATSUYAMA, E. et al. The CD38/NAD/SIRTUIN1/EZH2 Axis Mitigates Cytotoxic CD8

T Cell Function and Identifies Patients with SLE Prone to Infections. **Cell Reports**, v. 30, n. 1, p. 112- 123.e4, 2020.

KAUPPINEN, A. et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 10, p. 1939–1948, 2013.

KEIRAN, N. et al. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. **Nature Immunology**, v. 20, n. 5, p. 581–592, 2019.

KIM, D. S. et al. Suberoylanilide Hydroxamic Acid Attenuates Autoimmune Arthritis by Suppressing Th17 Cells through NR1D1 Inhibition. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.

KIM, K. E. et al. Myeloid-specific SIRT1 deletion aggravates hepatic inflammation and steatosis in high-fat diet-fed mice. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 19, n. 5, p. 451–460, 2015.

KLEIN, M.; BOPP, T. Cyclic AMP represents a crucial component of treg cell-mediated immune regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, p. 1–5, 2016.

KOH, A. et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016.

KONINGS, E. et al. The effects of 30 days resveratrol supplementation on adipose tissue morphology and gene expression patterns in obese men. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 3, p. 470–473, 2014.

KOSSEL, A.; LECTURE, N. Albrecht Kossel The Chemical Composition of the Cell Nucleus. p. 1–16, 2019.

KOZAKO, T. et al. Novel small-molecule SIRT1 inhibitors induce cell death in adult T-cell leukaemia cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

KWON, H.-S. et al. Three Novel Acetylation Sites in the Foxp3 Transcription Factor Regulate the Suppressive Activity of Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 6, p. 2712–2721, 2012.

LARCH, Y.; LAPOINTE, J. W.; KORNBERG, R. D. Nucleosomes Inhibit the Initiation of Transcription but Allow Chain Elongation with the Displacement of Histones. v. 49, p. 203–210, 1987.

LEDERER, D. J. et al. Obesity and Underweight Are Associated with an Increased Risk of Death after Lung Transplantation. n. 13, 2008.

LEE, J. O. et al. E3 ubiquitin ligase, WWP1, interacts with AMPK α 2 and down-regulates its expression in skeletal muscle C2C12 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 7, p. 4673–4680, 2013.

LEGUTKO, A. et al. Sirtuin 1 Promotes Th2 Responses and Airway Allergy by Repressing Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activity in Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4517–4529, 2011.

LENZ, M. et al. Adipose tissue in health and disease through the lens of its building blocks. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

LI, Q. et al. Tolerogenic Phenotype of IFN- γ -Induced IDO + Dendritic Cells Is

Maintained via an Autocrine IDO–Kynurenine/AhR–IDO Loop . **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 3, p. 962–970, 2016.

LI, X. et al. SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. **Molecular Cell**, v. 28, n. 1, p. 91–106, 2007.

LIM, J. et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. **FASEB Journal**, v. 27, n. 12, p. 4757–4767, 2013.

LIMAGNE, E. et al. Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation. **Cell Reports**, v. 19, n. 4, p. 746–759, 2017.

LIN, R. Crosstalk between Vitamin D metabolism, VDR signalling, and innate immunity. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 2, 2016.

LIU, G. et al. Dendritic cell SIRT1–HIF1 α axis programs the differentiation of CD4 + T cells through IL-12 and TGF- β 1 . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 9, p. E957–E965, 2015a.

LIU, G. et al. Dendritic cell SIRT1 – HIF1 α axis programs the differentiation of CD4 + T cells through IL-12 and TGF- β 1. **PNAS**, v. 112, n. October, p. E957–E965, 2015b.

LIU, H. W. et al. Pharmacological bypass of NAD⁺ salvage pathway protects neurons from chemotherapy-induced degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 42, p. 10654–10659, 2018.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. April, 2017.

LIU, T. F.; MCCALL, C. E. Deacetylation by SIRT1 Reprograms Inflammation and Cancer. **Genes & Cancer**, v. 4, n. April, p. 135–147, 2013.

LO, M. C. et al. Camptothecin activates SIRT1 to promote lipid catabolism through AMPK/FoxO1/ATGL pathway in C 2 C 12 myogenic cells. **Archives of Pharmacal Research**, 2019.

LONČAR, D. et al. Cardiovascular disease in kidney transplant patients. **Acta Medica Saliniana**, v. 46, n. 1, p. 32–39, 2017.

LU, J. et al. Adipose tissue-resident immune cells in obesity and type 2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–12, 2019.

LU, T. X. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 41, n. 9, p. 15–25, 2009.

LUO, Y. et al. Microbiota from Obese Mice Regulate Hematopoietic Stem Cell Differentiation by Altering the Bone Niche. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 886–894, 2015.

MA, L. et al. Serum SIRT1 is Associated with Frailty and Adipokines in Older Adults. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 23, n. 3, p. 246–250, 2019.

MACDOUGALL, C. E. et al. Visceral Adipose Tissue Immune Homeostasis Is Regulated by the Crosstalk between Adipocytes and Dendritic Cell Subsets. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 588- 601.e4, 2018.

MACIA, L. et al. Impairment of Dendritic Cell Functionality and Steady-State Number

in Obese Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 5997–6006, 2006.

MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6509–6519, 2000.

MARKEES, T. G. et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4⁺ T cells, interferon- γ , and CTLA4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 11, p. 2446–2455, 1998.

MARKS, E. et al. Regulation of IL-12p40 by HIF controls Th1/Th17 responses to prevent mucosal inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 5, p. 1224–1236, 2017.

MCCAUGHAN, J. A. et al. Epigenetics : Time to Translate Into Transplantation. v. 94, n. 1, p. 1–7, 2012.

MERAD, M.; GINHOUX, F.; COLLIN, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 935–947, 2008.

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.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 42, p. 10–21, 2014.

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.

MINHAS, P. S. et al. Macrophage de novo NAD⁺ synthesis specifies immune function in aging and inflammation. **Nature Immunology**, v. 20, n. 1, p. 50–63, 2019.

MIYAZAKI, Y. et al. A novel microRNA-132-sirtuin-1 axis underlies aberrant B-cell cytokine regulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–7, 2014.

MONDANELLI, G. et al. A Relay Pathway between Arginine and Tryptophan Metabolism Confers Immunosuppressive Properties on Dendritic Cells. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 233–244, 2017.

MORAES-VIEIRA, P. M. M.; SILVA, H. M.; TAKENAKA, M. C. S. Differential monocyte STAT6 activation and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. v. 71, p. 442–450, 2010.

MORITA, Y. et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: An implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1–10, 2012.

NANKIVELL, B. J.; ALEXANDER, S. I. Rejection of the Kidney Allograft. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. October, p. 1451–1462, 2010.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 443–468, 2013.

NAWAZ, A. et al. Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

NENCIONI, A. et al. Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 13, p. 3933–3941, 2007.

NEWTON, R.; PRIYADHARSHINI, B.; TURKA, L. A. Immunometabolism of regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 17, n. 6, p. 618–625, 2016.

NGUYEN, H. C. B. et al. Dichotomous engagement of HDAC3 activity governs inflammatory responses. **Nature**, v. 584, n. 7820, p. 286–290, 2020.

NIKSERESHT, S.; KHODAGHOLI, F.; AHMADIANI, A. Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia–reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1816–1826, 2019.

NISOLI, E. et al. Cell biology: Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 314–317, 2005.

NOAKES, R. The aryl hydrocarbon receptor: A review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 8, n. 1, p. 7–18, 2015.

NOMURA, M. et al. Fatty acid oxidation in macrophage polarization. **Nature Immunology**, v. 17, n. 3, p. 216–217, 2016.

NORIEGA, L. G. et al. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. **EMBO Reports**, v. 12, n. 10, p. 1069–1076, 2011.

O'NEILL, H. M.; HOLLOWAY, G. P.; STEINBERG, G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 366, n. 2, p. 135–151, 2013.

OWCZARCZYK, A. B. et al. Sirtuin 1 Regulates Dendritic Cell Activation and Autophagy during Respiratory Syncytial Virus-Induced Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 4, p. 1637–1646, 2015.

PARK, J. et al. Obesity and cancer - Mechanisms underlying tumour progression and recurrence. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 455–465, 2014.

PARK, S. H. et al. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2475–2482, 2002.

PATENTE, T. A.; PELGROM, L. R.; EVERTS, B. Dendritic cells are what they eat: how their metabolism shapes T helper cell polarization. **Current Opinion in Immunology**, v. 58, n. 4, p. 16–23, 2019.

PICARD, F. et al. Sirt1 promoted fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . v. 429, n. 6993, p. 771–776, 2010.

PICKETT, J. A protective HAT. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. March, p. 178–179, 2007.

PISCHON, T.; SHARMA, A. M. Obesity as a risk factor in renal transplant patients. p. 14–17, 2001.

PLUBELL, D. L. et al. GM-CSF driven myeloid cells in adipose tissue link weight gain

and insulin resistance via formation of 2-aminoadipate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

POLLARD, A. E. et al. AMPK activation protects against diet-induced obesity through Ucp1-independent thermogenesis in subcutaneous white adipose tissue. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 340–349, 2019.

PRASAD, G. S. et al. Crystal structure of transhydrogenase domain III at 1.2 Å resolution. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 12, p. 1126–1131, 1999.

PRICE, N. L. et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 675–690, 2012.

QIANG, L. et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparg. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 620–632, 2012.

QUANTE, M. et al. Obesity-related immune responses and their impact on surgical outcomes. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 6, p. 877–883, 2015.

QUINTANA, F. J. et al. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65–71, 2008.

RAD POUR, S. et al. Exhaustion of CD4⁺ T-cells mediated by the Kynurenine Pathway in Melanoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

REDDY, P. et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 11, p. 3921–3926,

2004.

REINHARDT, R. L. et al. Visualization of IL-12/23p40 In Vivo Reveals Immunostimulatory Dendritic Cell Migrants that Promote Th1 Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1618–1627, 2006.

ROGER, T. et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1205–1217, 2011.

ROTHHAMMER, V.; QUINTANA, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 3, p. 184–197, 2019.

RUSSO, M. J. et al. The Effect of Body Mass Index on Survival Following Heart. v. 251, n. 1, p. 144–152, 2010.

SABIR, M. S. et al. SIRT1 enzymatically potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ signaling via vitamin D receptor deacetylation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172, n. May, p. 117–129, 2017.

SAMOVSKI, D. et al. Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 4, p. 709–717, 2012.

SAMOVSKI, D. et al. Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to β -oxidation. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 353–359, 2015.

SANDFORT, V. et al. Obesity Is Associated With Progression of Atherosclerosis During Statin Treatment. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 7,

2016.

SCHLITZER, A. et al. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. **Nature Immunology**, v. 16, n. 7, p. 718–728, 2015.

SCHLITZER, A.; GINHOUX, F. Organization of the mouse and human DC network. **Current Opinion in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 90–99, 2014.

SCHMITT & SEGERT. Impact of Aging on Antigen Presentation Cell Function of Dendritic Cells Access. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

SCUTO, A. et al. SIRT1 activation enhances HDAC inhibition-mediated upregulation of GADD45G by repressing the binding of NF- κ B/STAT3 complex to its promoter in malignant lymphoid cells. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 5, p. 1–11, 2013.

SEPHAROSE, P. G. et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. **Cell**, v. 434, n. March, p. 1–6, 2005.

SERBULEA, V. et al. Macrophage phenotype and bioenergetics are controlled by oxidized phospholipids identified in lean and obese adipose tissue. **PNAS**, v. 115, n. 27, p. E6254–E6263, 2018.

SILVA, M. B. DA et al. Old game, new players: Linking classical theories to new trends in transplant immunology. **World Journal of Transplantation**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.

SNELL, B. G. D.; JACKSON, R. B.; HARBOUR, B. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of Genetic**, v. 49, n. 2, p. 87–108, 1948.

SONG, W. et al. HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 161–168, 2011.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 8, p. 609–620, 2002.

SUBSETS, D. C. et al. Visceral Adipose Tissue Immune Homeostasis Is Regulated by the Crosstalk between Adipocytes and Dendritic Cell Subsets. **Cell Metabolism**, v. 27, n. March, p. 588–601, 2018.

SULLIVAN, T. E. O. et al. Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 428–441, 2016.

TAKAHASHI, B. T. et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, 2000.

TAMURA, T. et al. IFN Regulatory Factor-4 and -8 Govern Dendritic Cell Subset Development and Their Functional Diversity. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2573–2581, 2005.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, 2018.

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.

TASAKI, P. **Histocompatibility. History of transplantation. In History of transplantation: Thirty-five recollections** Los Angeles, 1990.

TESCHENDORFF, A. E.; RELTON, C. L. Statistical and integrative system-level analysis of DNA methylation data. **Nature Publishing Group**, v. 19, n. 3, p. 129–147, 2017.

THWE, P. M. et al. Cell-Intrinsic Glycogen Metabolism Supports Early Glycolytic Reprogramming Required for Dendritic Cell Immune Responses. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 558- 567.e5, 2017.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006.

TORNATORE, L. et al. The nuclear factor kappa B signaling pathway: Integrating metabolism with inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 557–566, 2012.

TRANSPLANTES, R. B. DE. **ABTO: Associação Brasileira de Transplantes de Orgãos.**

TUNG, S. L. et al. Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

VISWANATHAN, M. et al. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. **Developmental Cell**, v. 9, n. 5, p. 605–615, 2005.

WAGNER, G. R.; HIRSHEY, M. D. Nonenzymatic Protein Acylation as a Carbon Stress Regulated by Sirtuin Deacylases. **Molecular Cell**, v. 54, n. 1, p. 5–16, 2014.

WANG, H. et al. Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue

fibrosis and diabetes in obesity. **Nature Communications**, v. 10, n. February, p. 1–14, 2019.

WANG, H.; QIANG, L.; FARMER, S. R. Identification of a Domain within Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Regulating Expression of a Group of Genes Containing Fibroblast Growth Factor 21 That Are Selectively Repressed by SIRT1 in Adipocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 1, p. 188–200, 2008.

WANG, Y. et al. Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4⁺ T Cells. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1337–1349, 2016.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEISS, E. S. et al. Impact of Recipient Body Mass Index on Organ Allocation and Mortality in Orthotopic Heart Transplantation. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 28, n. 11, p. 1150–1157, 2009.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/>.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Federation**.

WOO, S. J. et al. Myeloid deletion of SIRT1 suppresses collagen-induced arthritis in mice by modulating dendritic cell maturation. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. e221-9, 2016.

WOOD, K. J.; GOTO, R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. **Transplantation**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.

XIAO, L. et al. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4 + T cells via upregulating MHCII in obesity. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 1, p. 112–120, 2016.

XU, L. et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway by resveratrol improves spinal cord injury. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. OCT, p. 1–10, 2018.

XU, M. M. et al. Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein α Signaling. **Immunity**, v. 47, n. 2, p. 363- 373.e5, 2017.

YANG, F. et al. The effect of immunosuppressive drugs on MDSCs in transplantation. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

YANG, H. et al. Histone deacetylase sirtuin 1 deacetylates IRF1 protein and programs dendritic cells to control Th17 protein differentiation during autoimmune inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 52, p. 37256–37266, 2013.

YANG, S. Y. et al. Downregulation of angiotensin type 1 receptor and nuclear factor- κ B by sirtuin 1 contributes to renoprotection in unilateral ureteral obstruction. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–12, 2016.

YEUNG, F. et al. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by

the SIRT1 deacetylase. **EMBO Journal**, v. 23, n. 12, p. 2369–2380, 2004.

YOKOTA, T. et al. Adiponectin, a Fat Cell Product, Influences the Earliest Lymphocyte Precursors in Bone Marrow Cultures by Activation of the Cyclooxygenase-Prostaglandin Pathway in Stromal Cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5091–5099, 2003.

YOON, M. J. et al. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice Article SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD⁺ and Function in Mice. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 706–717, 2015.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J. Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikk β . **Science**, v. 293, n. August, p. 1663–1677, 2001.

ZHANG, J. et al. Switch of NAD Salvage to de novo Biosynthesis Sustains SIRT1-RelB-Dependent Inflammatory Tolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–15, 2019.

ZHANG, X. et al. SAHA, an HDAC inhibitor, synergizes with tacrolimus to prevent murine cardiac allograft rejection. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 9, n. 5, p. 390–398, 2012.

ZHANG, X. et al. Sirtuin 1 activation protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.

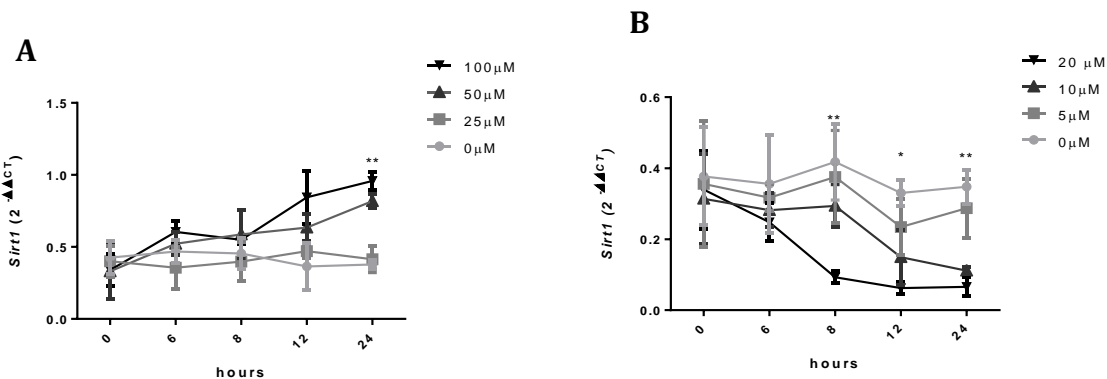
ZHAO, F. et al. Paracrine Wnt5a- β -Catenin Signaling Triggers a Metabolic Program that Drives Dendritic Cell Tolerization. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 147- 160.e7, 2018a.

ZHAO, F. et al. Paracrine Wnt5a- β -Catenin Signaling Triggers a Metabolic Program that Drives Dendritic Cell Tolerization. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 147- 160.e7, 2018b.

ZHOU, Y. et al. SIRT1 suppresses adipogenesis by activating Wnt/ β -catenin signaling in vivo and in vitro. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77707–77720, 2016.

ZLOTNIKOV-KLIONSKY, Y. et al. Perforin-Positive Dendritic Cells Exhibit an Immuno- regulatory Role in Metabolic Syndrome and Article Perforin-Positive Dendritic Cells Exhibit an Immuno-regulatory Role in Metabolic Syndrome and Autoimmunity. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 776–787, 2015.

ANEXO



Anexo 1 - qPCR de *Sirt1* com o teste de efeito dose resposta sob diferentes tempos e concentrações de RES e EX-527 em BMDCs/SD.

Expressão de *Sirt1* ($2^{-\Delta\Delta CT}$ /fold change relativo ao mRNA de *B-actina*) de BMDCs/SD tratadas com RES em diferentes concentrações e e tempos **(A)**. Expressão de *Sirt1* ($2^{-\Delta\Delta CT}$ /fold change relativo ao mRNA de *B-actina*) de BMDCs/SD tratadas com Ex-527 em diferentes concentrações e tempos **(B)**. Os valores de significância (p) seguiram a seguinte ordem: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$, os quais foram estabelecidos pelo teste One-way ANOVA ou t-Test quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 8®. O n experimental de cada um dos resultados apresentados foi de 3 animais por grupo, com duas repetições experimentais.