

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LUIZA MENEZES SILVA

EFEITO DA VIA COLINÉRGICA SOBRE ALTERAÇÕES CELULARES E
METABÓLICAS NO TECIDO ADIPOSEO

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

LUÍSA MENEZES SILVA

EFEITO DA VIA COLINÉRGICA SOBRE ALTERAÇÕES CELULARES E
METABÓLICAS NO TECIDO ADIPOSEO

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Denise Morais da Fonseca

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)

Menezes Silva, Luísa

Efeito da via colinérgica sobre alterações celulares e
metabólicas no tecido adiposo / Luísa

Menezes Silva; orientadora Denise Morais da Fonseca. --
São Paulo, 2020.

130 p.

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

1. tecido adiposo. 2. acetilcolina. 3. sistema imune. 4.
via colinérgica. I. Morais da Fonseca, Denise, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Luísa Menezes Silva

Título da Dissertação: Efeito da via colinérgica sobre alterações celulares e metabólicas no tecido adiposo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Moraes da Fonseca

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a __/__/__, considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Universidade Armando de Albuquerque - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de São Paulo - USP - Av. do Trabalhador - Ribeirão Preto - SP - CEP: 13061-970
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3081-3000 - E-mail: ceua@icb.usp.br

Decl. CEUA.128.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **49/2016/CEUA**, válido até 14/06/2020, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Denise Moraes da Fonseca**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Luisa Menezes Silva** ao Projeto de Pesquisa "*Cicatriz Imunológica' pós-infecção intestinal aguda e desenvolvimento de desordens metabólicas: estudo das interações entre a microbiota e sistema imunológico do mesentério*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 14 de agosto de 2018.

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

Ilmo(a). Sr(a):
Responsável: Denise Morais Da Fonseca
Área: Imunologia

Título da proposta: "Interações neuroimunes no desenvolvimento da [cicatriz imunológica] após infecção intestinal aguda".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000110)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/abril/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito as medidas necessárias à Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP para que seja incluída a aluna "Luisa Menezes Silva" ao protocolo de experimentação animal nº 8909191118 referente ao projeto intitulado " Interações neuroimunes no desenvolvimento da "cicatriz imunológica" após infecção intestinal aguda" aprovado em 13/12/2018, sob minha responsabilidade. Declaro que não houve alteração de metodologia experimental nem das técnicas descritas inicialmente quando da aprovação do referido protocolo de experimentação animal. Estamos cientes e de acordo com as regras adotadas pela CEUA. Consultamos os "links" indicados no protocolo e comprometemo-nos a proceder conforme as informações aqui fornecidas. Estamos cientes de que as regras adotadas pela CEUA estão de acordo com a legislação nacional e internacional vigente. "

Comentário da CEUA: "Aprovada a inclusão da aluna Luisa Menezes Silva ao projeto vigente 8909191118.".



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)

*Dedico este trabalho aos meus melhores amigos,
Letícia e Luís Augusto.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela conclusão de mais uma etapa.

Agradeço à minha família por sempre se fazer presente, mesmo na distância; aos meus pais, **Delmar** e **Rosália**, que me dão suporte e fortaleza desde antes do meu existir; aos meus irmãos, **Letícia** e **Luís Augusto**, os meus melhores amigos.

À minha avó e minhas madrinhas, por todo apoio. A todos os membros da minha família que estiveram acompanhando esta jornada de perto.

Aos meus amigos em Formiga, Uberaba, São Paulo, e às muitas pessoas queridas que tive a oportunidade de encontrar nesta jornada, por me darem suporte e fortaleza, em todos os momentos.

Aos amigos do **Laboratório de Imunologia de Mucosas - LABIM**, pela oportunidade de conviver com todos durante dois anos, eternos companheiros, na bancada ou nos “rolês” (sic). Agradeço à velha guarda, **Mirian** e **Marcela**, que traçaram novos caminhos, mas antes puderam compartilhar conosco o conhecimento. Às minhas mestrandas queridas, **Jaqueline** e **Bárbara**; mais que colegas de jornada, vocês se mostraram grandes amigas nesse caminho, dando suporte e conselhos quando eu me desesperava. Aos meus doutorandos queridos, **Marina** e **Caio**, obrigada por me ouvirem e me ajudarem em todos os experimentos megalomaníacos que eu planejava. Nunca esqueçam da capacidade de vocês, e aonde chegaram. À nossa técnica, **Raquel**, por todo suporte no laboratório. Agradeço também a todos os alunos de Iniciação Científica que passaram pelo laboratório nestes dois anos; que a jornada científica de todos seja agradável. A todos vocês, meus amigos de **LABIM**, também peço desculpas pelas vezes que falhei, por correria ou impaciência. Todos os erros e acertos me ajudaram a moldar quem sou hoje, e espero de coração que eu possa ter contribuído além de presença em experimentos, com exemplos concretos de vivência científica.

Gostaria de deixar um agradecimento especial à minha orientadora, **Denise**. Obrigada por todos os ensinamentos nestes dois anos, e por me acolher em seu grupo de pesquisa mesmo antes de me conhecer. Sou grata a você, por me ensinar a fazer ciência de qualidade e a pensar cientificamente, e por fornecer suporte mesmo

quando tínhamos opiniões divergentes. Mais que o conhecimento adquirido, permanece em mim o respeito e admiração pela profissional que é, e gratidão por todas as oportunidades que me foram concedidas em seu laboratório. Parafraseando Newton, “Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”.

Agradeço também a todos que contribuíram cientificamente para a conclusão deste trabalho: **Prof.^a Carla Máximo Prado** (UNIFESP); **Prof. José Donato Junior** (ICB/USP); **Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara** (ICB/USP); **Dr.^a Meire Yoshie Hiyane** (ICB/USP); **Dr. Walter Miguel Turato** (FCF/USP), **Dr. José Carlos Alves Filho** (FMRP/USP) e **Dr. Ricardo Wesley Alberca Custódio** (FM/USP). Todas as sugestões, discussões de resultado, equipamentos e materiais fornecidos certamente foram cruciais para o bom andamento deste projeto. Meu muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do ICB, em especial **Igor** (meu “migo” predileto), o companheiro de baladas que se tornou companheiro de histórias da vida! Um obrigado especial ao meu amigo e futuro mestre **Jean**, que foi por muitas vezes meu confidente nos momentos bons e ruins. Também quero oferecer meu muito obrigada a todos os meus colegas de jornada científica no ICB que não foram citados aqui, mas que tive a honra de encontrar por esse caminho. Vocês certamente foram muito importantes na minha formação científica e profissional, nas disciplinas ou conversas do dia-a-dia.

Agradeço também a todos os funcionários do ICB IV, meus amigos da portaria, da limpeza, do biotério, da vigia, da manutenção, da secretaria, da sala de lavagem e do CEFAP/USP. A vocês, que também contribuem para que a ciência prossiga na nossa instituição, o meu muito obrigada!

Agradeço também àqueles com quem tive oportunidade de dividir parte da minha vida nestes dois anos, convivendo e compartilhando pedaços muito especiais da minha passagem por São Paulo: **Rosmary** e **Stephanie**, minhas queridas peruanas. Ao **João** (Xu), que compartilhou comigo vários momentos épicos, desde a aquisição de um filtro de barro até a compra de água às 1 da manhã... Ao Caio, por me permitir conviver com o **Fenrir**, vulgo “melhor gato de todos”. E de forma muito especial, à **Jamile** (Jam): que arrependimento não ter te conhecido antes! É incrível como algumas pessoas aparecem do nada, das formas mais sutis, e desenvolvem com você vínculos nos quais se observa a verdadeira amizade. Passar uma pandemia me aguentando não é moleza! Por isso, só posso te agradecer por me ouvir, auxiliar,

ensinar e aconselhar durante esses dias. Sua amizade é um presente para toda a vida...

Por fim, agradeço às agências de fomento que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, **FAPESP** (Projetos 2015/25364-0; 2018/15981-0), **CAPES** (PROEX) e **CNPq**.

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof. Dr.^a Denise Morais da Fonseca, desenvolvido no Laboratório de Imunologia de Mucosas – LABIM, no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Conselho de Apoio à pesquisa no ensino superior - CAPES (PROEX), e da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 2016/25364-0 e 2018/15981-0).

“Do what you love and what you think you are good at.”

Donna Strickland

RESUMO

SILVA, L.M. Efeito da via colinérgica sobre alterações celulares e metabólicas no tecido adiposo. 2020. 130f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A compreensão dos mecanismos que sustentam a homeostase metabólica e imunológica nos diferentes compartimentos do tecido adiposo é essencial uma vez que estes tecidos contribuem ativamente para a origem de distúrbios metabólicos. O controle da inflamação pela via colinérgica é um dos mecanismos neuroimunes mais estudados atualmente. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da acetilcolina na homeostase imunológica e metabólica do tecido adiposo. Nosso objetivo foi entender a comunicação entre os sistemas nervoso e imune no contexto de alterações celulares e metabólicas no tecido adiposo. Para isso, usamos camundongos transgênicos VACht *knockdown* (KD), tratados farmacologicamente, ou vagotomizados (VgX) para caracterizar as células do sistema imunológico em diferentes compartimentos de tecido adiposo na deficiência de acetilcolina (ACh). Foi encontrado um enriquecimento significativo no infiltrado de células T efectoras e produção de citocinas, em particular aquelas relativas ao perfil de resposta Th2 nos animais com sinalização de ACh reduzida. Isso foi observado principalmente no tecido adiposo mesentérico (mesWAT), mas não no tecido adiposo subcutâneo, linfonodo mesentérico ou baço destes animais. Em seguida, para entender o impacto metabólico no tecido adiposo impulsionado pela via colinérgica, tratamos camundongos com uma dieta hiperlipídica (HFD) para a indução de obesidade e resistência à insulina. Camundongos com bloqueio da via colinérgica tratados com HFD apresentaram melhor performance metabólica em comparação aos controles, como ganho de peso reduzido, melhor resposta à insulina e menor acúmulo de gordura. Além disso, as populações celulares presentes no tecido adiposo mesentérico destes animais obesos com inibição da via colinérgica produziram mais citocinas do perfil Th2 em relação ao grupo controle na mesma dieta. Por fim, analisamos o papel da inervação colinérgica e produção de acetilcolina por células de diferentes tecidos. Verificamos que a densidade de fibras colinérgicas e células produtoras de acetilcolina é diferente entre os depósitos de tecido adiposo, sendo maior nos tecidos viscerais. De forma especial, as células linfoides inatas (ILCs) do mesWAT apresentaram grande densidade da enzima produtora de acetilcolina. Dessa forma, nossos dados sugerem que o sistema colinérgico é capaz de controlar o tônus imunológico dos compartimentos do tecido adiposo, principalmente o mesentérico, e pode estar envolvida no desenvolvimento de distúrbios metabólicos.

Palavras chave: tecido adiposo; acetilcolina; sistema imune; via colinérgica.

ABSTRACT

SILVA, L.M. Effect of the cholinergic pathway in cellular and metabolic changes in the adipose tissue. 2020. 130f. Master thesis. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Understand the mechanisms that support metabolic and immunological homeostasis in the different adipose tissue compartments is essential since these tissues actively contribute to the origin of metabolic disorders. Cholinergic inflammation control is one of the most studied neuroimmune mechanisms today. However, little is known about the influence of acetylcholine on the immune and metabolic homeostasis of adipose tissue. Our goal is to understand the communication between the nervous and immune systems in the context of cellular and metabolic changes in adipose tissue. For this, we used VACht knockdown (KD) transgenic mice, pharmacologically treated or vagotomized (VgX) to characterize immune cells in the adipose tissue compartments in acetylcholine deficiency (ACh). Significant enrichment was found in the infiltrate of cells and cytokines related to the Th2 response profile in animals with reduced ACh signaling. This was observed mainly in the mesenteric adipose tissue (mesWAT), but not in the subcutaneous adipose tissue, mesenteric lymph node or spleen of these animals. Then, in order to understand the metabolic impact on adipose tissue driven by the cholinergic pathway, we treated mice with a high-fat diet (HFD) to induce obesity. HFD-treated mice with cholinergic pathway showed better metabolic performance compared to controls, such as reduced weight gain, better insulin response and less fat accumulation. In addition, the cell populations present in the mesenteric adipose tissue of these obese animals produce more cytokines of the Th2 profile compared to the control group on the same diet. Finally, we analyze the role of cholinergic innervation and production of acetylcholine by cells from different tissues. We have seen that the density of cholinergic fibers and cells that produce acetylcholine is different between adipose tissue deposits, being higher in visceral tissues. In particular, mesWAT innate lymphoid cells (ILCs) have a high density of the acetylcholine-producing enzyme. Thus, our data suggest that the cholinergic system can control the immune tone of adipose tissue compartments, mainly visceral, and may be involved in the development of metabolic disorders.

Keywords: adipose tissue; acetylcholine; immune system; cholinergic pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégias de gate para identificação de células linfoides e mieloides. ..	46
Figura 2 – Estratégias de gate para identificação das populações celulares de origem linfoide.	47
Figura 3 – Estratégias de gate para identificação do perfil de produção de citocinas.	48
Figura 4 – t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding – tSNE.....	49
Figura 5 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, scWAT e baço de camundongos WT e VACht KD.	52
Figura 6 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfoide nos tecidos de animais WT e VACht KD.....	54
Figura 7 – Caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e células T TCR- $\gamma\delta$ em animais WT e VACht KD.....	55
Figura 8 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais WT e VACht KD.....	57
Figura 9 – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4+ em animais WT e VACht KD.	58
Figura 10 – Expressão de CD44 e Ki67 nas células linfoides do mesWAT, scWAT e baço de animais WT e VACht KD.	59
Figura 11 - Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, mLN e baço de camundongos tratados com salina e mecamilamina.	61
Figura 12 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfoide nos tecidos de camundongos tratados com salina e mecamilamina.....	62
Figura 13 – Caracterização fenotípica das células T CD4+, células T TCR- $\gamma\delta$ e células T CD8+ em animais tratados com salina ou mecamilamina.	63
Figura 14 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais tratados com salina ou mecamilamina.	65
Figura 15 - Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4+ em animais tratados com salina ou mecamilamina.	66
Figura 16 – Expressão de CD44 e Ki67 nas células do mesWAT, mLN e baço de animais tratados com a mecamilamina.	67

Figura 17 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos após vagotomia unilateral.....	68
Figura 18 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfóide nos tecidos de animais vagotomizados.....	70
Figura 19 – Caracterização fenotípica das células T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e células TCR-γδ e em animais vagotomizados.	71
Figura 20 - Perfil de produção de citocinas pelas células linfóides em animais vagotomizados.	72
Figura 21 – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4 ⁺ em animais vagotomizados.....	73
Figura 22 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.	76
Figura 23 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.....	77
Figura 24 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais WT e VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.....	78
Figura 25 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.....	80
Figura 26 – Peso dos tecidos adiposos de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.	81
Figura 27 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais com inibição farmacológica da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.	82
Figura 28 – Peso corpóreo e o perfil metabólico de animais vagotomizados e tratados com dieta hiperlipídica.....	85
Figura 29 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VgX tratados com dieta hiperlipídica.....	86
Figura 30 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais SHAM e VgX tratados com dieta hiperlipídica.....	88
Figura 31 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.....	90
Figura 32 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfóides do mesWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.....	92
Figura 33 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfóides do scWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.....	93

Figura 34 – Caracterização das populações celulares mieloides presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VgX submetidos à dieta hiperlipídica.	95
Figura 35 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do mesWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica.	96
Figura 36 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do scWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica.	97
Figura 37 – Captação de 2-NBDG pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD.....	99
Figura 38 – Captação de Bodipy pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD.....	100
Figura 39 – Análise da inervação colinérgica em diferentes tecidos adiposos viscerais.	102
Figura 40 – Análise da inervação colinérgica em tecidos adiposos parietais e no intestino.	104
Figura 41 – Análise da expressão de ChAT pelas células do sistema imune presentes no mesWAT.....	105
Figura 42 – Análise da expressão de ChAT pelas células do sistema imune presentes no intestino, pgWAT, scWAT e baço de animais reporter.	106

LISTA DE MATERIAIS SUPLEMENTARES

- MATERIAL SUPLEMENTAR 1** – Quadro representativo do número total de células nos mesentérios dos camundongos WT e VACht KD e ajuste do número pelo peso do tecido.....74
- MATERIAL SUPLEMENTAR 2** – Caracterização das populações celulares presentes no intestino de camundongos tratados com salina ou mecamilamina.....79
- MATERIAL SUPLEMENTAR 3** - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais tratados com nicotina sob dieta hiperlipídica.....80
- MATERIAL SUPLEMENTAR 4** - Peso dos tecidos adiposos de animais tratados com nicotina sob dieta hiperlipídica.....81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ACh – acetilcolina

ACK – tampão de lise de hemácias, do inglês “*ammonium-chloride-potassium*”

ADSC - célula tronco precursora derivadas de adipócitos, do inglês “*adipocyte derived stem cell*”

Adr – adrenalina

ATP – adenosina trifosfato, do inglês “*adenosine triphosphate*”

AUC – área sob a curva, do inglês “*area under curve*”

BAT – tecido adiposo marrom, do inglês “*brown adipose tissue*”

Bodipy – 4,4-difloro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indaceno

BSA – albumina de soro bovino, do inglês “*bovine serum albumin*”

CEFAP – centro de facilidades e apoio à pesquisa

CEUA – comitê de ética no uso de animais de experimentação

ChAT – colina acetiltransferase, do inglês “*choline acetyltransferase*”

CHOW – dieta controle

CHT1 – transportador de colina de alta afinidade, do inglês “*high-affinity choline transporter 1*”

DMEM – meio Dulbecco MEM, do inglês “*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*”

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês “*deoxyribonucleic acid*”

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “*ethylenediaminetetraacetic acid*”

FALC – folículo linfóide associado a gordura, do inglês “*fat associated lymphoid cluster*”

GLUT – transportador de glicose, do inglês “*glucose transporter*”

GTT – teste de tolerância à glicose, do inglês “*glucose tolerance test*”

h – hora

HBSS – solução salina balanceada de Hanks, do inglês “*Hanks' balanced salt solution*”

HE – hematoxilina e eosina

HFD – dieta hiperlipídica, do inglês “*high fat diet*”

ILC – célula linfoide inata, do inglês “*innate lymphoid cells*”

I.P. – intraperitoneal

ITT – teste de tolerância à insulina, do inglês “*insulin tolerance test*”

K.D. – do inglês “*knockdown*”

LPS – lipopolissacarídeo

mAChR – receptor muscarínico de acetilcolina, do inglês “*muscarinic acetylcholine receptor*”

MECA – Mecamilamina

mesWAT – tecido adiposo mesentérico, do inglês “*mesenteric white adipose tissue*”

MFI – intensidade média de fluorescência, do inglês “*median fluorescence intensity*”

min – minutos

mLN – linfonodo mesentérico, do inglês “*mesenteric lymph node*”

NA –noradrenalina

NaCl – cloreto de sódio

nAChR – receptor nicotínico de acetilcolina, do inglês “*nicotinic acetylcholine receptor*”

NICO – nicotina

O₂ – oxigênio

omWAT - tecido adiposo omental, do inglês “*omental white adipose tissue*”

PBS – tampão fosfato salino estéril, do inglês “*phosphate buffered saline*”

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês “*polimerase chain reaction*”

pgWAT – tecido adiposo perigonadal, do inglês “*perigonadal white adipose tissue*”

PIR – brometo de piridostigmina

PMA – acetato miristato de forbol, do inglês “*phorbol myristate acetate*”

RER – razão de troca respiratória, do inglês “*respiratory exchange ratio*”

RFP – proteína fluorescente vermelha, do inglês, “*red fluorescent protein*”

RNA – ácido ribonucleico, do inglês “*ribonucleic acid*”

RPMI – meio do Instituto Memorial Roswell Park, do inglês “*Roswell Park Memorial Institute medium*”

scWAT – tecido adiposo subcutâneo, do inglês “*subcutaneous white adipose tissue*”

SFB – soro fetal bovino

SNC – sistema nervoso central

SNA – sistema nervoso autônomo

SPF – livre de patógenos específicos, do inglês “*specific pathogen free*”

TCR – receptor de célula T, do inglês “*T cell receptor*”

TH – Tirosina Hidroxilase, do inglês “*tyrosine hydroxylase*”

tSNE – do inglês “*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*”

UCP1 – proteína de desacoplamento 1, do inglês “*uncoupling protein 1*”

VACht – transportador vesicular de acetilcolina, do inglês “*vesicular acetylcholine transporter*”

WAT – tecido adiposo branco, do inglês “*white adipose tissue*”

WT – camundongo selvagem, do inglês “*wild type*”

2-NBDG – 2-desoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] -D-glicose

SUMÁRIO

1. Introdução	23
1.1 – O tecido adiposo e suas funções	23
1.2 – Sistema imune associado ao tecido adiposo	26
1.3 – Mecanismos de controle e homeostase do tecido adiposo.....	28
1.4 – O sistema nervoso autônomo e o controle da resposta imune	31
1.5 – Sinalização colinérgica e atividade anti-inflamatória.....	33
2. Objetivos	37
2.1 - Objetivo geral	37
2.2 – Objetivos específicos	37
3. Materiais e Métodos	38
3.1 – Camundongos	38
3.2 – Tratamento com agonista e antagonista colinérgico.....	38
3.3 – Cirurgia de vagotomia unilateral	39
3.4 - Dieta hiperlipídica e indução de obesidade	40
3.5 – Pesagem semanal e testes de tolerância à glicose/insulina	40
3.6 – Análise da distribuição de gordura corpórea.....	41
3.7 – Análise do perfil metabólico dos animais	41
3.8 – Tratamento com 2-NBDG e Bodipy	42
3.9 – Processamento dos tecidos e extração celular.....	42
3.10 – Análise das populações celulares por citometria de fluxo.....	43
3.11 – tSNE – <i>t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding</i>	49
3.12 – Histologia	50
3.13 – Análise estatística	50
4. Resultados	51
4.1 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos VACht KD ^{HOM}	51
4.2 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos após tratamento com mecamilamina.....	59
4.3 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos submetidos à vagotomia unilateral	67
4.4 – Perfil metabólico de animais VACht KD ^{HOM} submetidos à dieta hiperlipídica	74
4.5 – Perfil metabólico de animais tratados com mecamilamina submetidos à dieta hiperlipídica.....	79

4.6 – Perfil metabólico de animais vagotomizados submetidos à dieta hiperlipídica	83
4.7 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de animais obesos após bloqueio da via colinérgica	89
4.8 – Perfil metabólico das células do sistema imune no tecido adiposo de animais após inibição da via colinérgica	98
4.9 – Avaliação da inervação colinérgica e produção celular de acetilcolina no tecido adiposo.....	101
5. Discussão.....	107
6. Conclusões.....	114
7. Revisão Bibliográfica	115
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	125
ANEXOS	129

1. Introdução

1.1 – O tecido adiposo e suas funções

A função principal do tecido adiposo no organismo de vertebrados é a reserva lipídica e armazenamento de energia. Porém, ao longo dos anos, este tecido tem sido amplamente estudado quanto a seus aspectos fisiológicos, bioquímicos e imunológicos em relação às funções de regulação metabólica que é capaz de exercer. O tecido adiposo possui ampla gama de funções, como armazenamento de energia, sustentação de órgãos, carreamento de vasos e nervos aos órgãos destino, geração de calor e controle de temperatura corporal, armazenamento de células imunes de memória, controle da produção de hormônios relacionados à fome e homeostase energética, dentre outras (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). O tecido adiposo é formado majoritariamente por células conhecidas como adipócitos, que são a principal classe celular responsável pelo armazenamento de ácidos graxos no organismo e pela geração de energia. Além dos adipócitos, encontramos ali células da fração estromal, como precursores de adipócitos e células fibroblásticas, matriz conjuntiva, células tronco mesenquimais, células mesoteliais, células da vasculatura, tecido nervoso e células do sistema imune. Juntos, esses componentes funcionam como uma unidade integrada para manutenção da homeostase (KERSHAW; FLIER, 2004).

Os adipócitos são o tipo celular predominante no tecido adiposo (GARCÍA-RUBIO et al., 2018). As principais funções do tecido adiposo são determinadas pelo subtipo de adipócito que o constitui. Até recentemente, foram descritos pelo menos 4 tipos principais de adipócitos, com diferentes características peculiares que garantem a função do tecido adiposo: adipócitos brancos, bege, marrons e rosas (CORRÊA; HEYN; MAGALHAES, 2019; GIORDANO et al., 2014; LEKKAS; PASCHOS, 2019). Os adipócitos brancos (do inglês, *white adipocytes*) são os principais responsáveis no armazenamento de lipídios provenientes da alimentação e estoque de energia corporal. Eles compõem o principal tipo de tecido adiposo nos mamíferos, o tecido adiposo branco (WAT, do inglês *white adipose tissue*), que é caracterizado como um grande centro regulador e de armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis. Dois outros tipos de adipócitos com funções interessantes são os adipócitos bege e

Introdução

marrons. Estes, noutra via, não tem como função principal o armazenamento lipídico. De fato, são eles os principais responsáveis pela geração de calor e manutenção da temperatura corporal do organismo de mamíferos (IKEDA; MARETICH; KAJIMURA, 2018; MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2012; SEALE et al., 2008). Para isso, as mitocôndrias do tecido adiposo marrom – BAT (do inglês, *brown adipose tissue*) – contêm uma proporção maior de uma proteína transmembrana conhecida como proteína desacopladora do tipo 1 (UCP1). Dessa forma, a produção de ATP no tecido adiposo marrom culmina em formação de calor, através da fosforilação oxidativa em um sistema desacoplado. Recentemente, foram também caracterizados os adipócitos rosa (do inglês, *pink adipocytes*) (CINTI, 2018). Durante a gravidez e lactação, adipócitos brancos do tecido subcutâneo podem se converter em glândulas produtoras de leite, que por sua vez são formadas por elementos ricos em lipídios. Estas células peculiares são definidas como adipócitos rosa. Elas são caracterizadas por apresentarem lipídios citoplasmáticos abundantes, por serem células adiposas parenquimatosas e atribuírem um aspecto rosado ao tecido.

Outro conjunto celular que pode ser encontrado no tecido adiposo corresponde à fração estromal. Essa fração é constituída por células fibroblásticas, pré-adipócitos, células tronco precursoras derivadas de adipócitos (ADSCs), precursores endoteliais, células endoteliais, pericitos, células mesoteliais, entre outras (BORA; MAJUMDAR, 2017). A fração estromal vascular corresponde àquela que constitui vasos sanguíneos ou linfáticos no tecido, sendo caracterizada pela alta expressão de integrinas de adesão e de CD31 (MAHLAKÖIV et al., 2019). A fração não vascular, ou as células fibroblásticas do parênquima, são importantes, não somente na estruturação e recuperação tecidual, mas também para recrutar células do sistema imunológico para o tecido adiposo, através da produção de fatores como CCL19, CCL21, CXCL13 e IL-33 (BOURIN et al., 2013; MAHLAKÖIV et al., 2019; PEREZ-SHIBAYAMA et al., 2018). Algumas destas células podem ser precursoras de adipócitos, ou pré-adipócitos (LEKKAS; PASCHOS, 2019; WON PARK; HALPERIN; TONTONOZ, 2008). Estas células garantem a renovação tecidual, e estão presentes em grandes quantidades nas etapas iniciais da vida, onde a estrutura tecidual é formada. Outras células de origem fibroblástica que estão presentes, especialmente nos tecidos adiposos viscerais (em contato com cavidades) são as células mesoteliais. Estas células recobrem o tecido adiposo em contato com a cavidade peritoneal ou torácica.

Introdução

Recentemente, essa fração vem sendo estudada quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias e controle da migração celular para cavidades, além de controlar o tônus imune no tecido adiposo pela alta produção de IL-33 (JACKSON-JONES et al., 2020; MAHLAKÖIV et al., 2019).

O tecido adiposo também é capaz de produzir e secretar diversos hormônios e moléculas de sinalização, muitas vezes sendo referido também como um órgão endócrino (KERSHAW; FLIER, 2004; TRAYHURN; BEATTIE, 2001; TRAYHURN; BING; WOOD, 2006). O tecido adiposo produz fatores como leptina, adiponectina e resistina, importantes sinalizadores que promovem a regulação do próprio tecido adiposo e podem atuar inclusive no sistema nervoso central (SNC), regulando o apetite e ingestão alimentar. Ele também contribui no metabolismo de esteroides sexuais e glicocorticoides, por ser fonte de reserva lipídica. Ainda, é capaz de secretar diversas citocinas, conhecidas como adipocinas, que atuam de maneira autócrina, parácrina ou endócrina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Além desses sinais, o tecido adiposo possui receptores que permitem responder aos sistemas hormonais tradicionais ou sinais neurais (PARIMISSETTY et al., 2016). Assim, além das suas funções endócrinas, o tecido adiposo pode responder ao controle pelas vias hormonais clássicas ou sinalização via neurotransmissores. As vias neurais que controlam o tecido adiposo são feitas principalmente pelo sistema nervoso autônomo (SNA). No tecido adiposo marrom, por exemplo, há grande densidade de sinalização do SNA simpático, o que controla a geração e liberação de calor por este tecido (GUILHERME et al., 2019; LEE et al., 2012; MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2012). Através desta integração, vários processos biológicos são controlados, como metabolismo energético, função neuroendócrina e função imunológica (FRANCO et al., 2007; KERSHAW; FLIER, 2004).

Tanto o excesso quanto a deficiência de tecido adiposo apresentam consequências metabólicas prejudiciais. O acúmulo de tecido adiposo, caracterizado pela obesidade, está associado à resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão e estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios (KERSHAW; FLIER, 2004). Da mesma forma, lipodistrofia também pode acarretar consequências para o organismo. Indivíduos com deficiência de tecido adiposo, tendem a combater com maior dificuldade patógenos oportunistas. Sendo assim, distúrbios relacionados ao

tecido adiposo e suas consequências representam atualmente encargos médicos e socioeconômicos. A inflamação crônica do tecido adiposo pode levar ao remodelamento inadequado da matriz extracelular e recrutamento de mais leucócitos inflamatórios para o tecido, o que pode ter influências drásticas tanto na adipogênese quanto na lipólise, acarretando problemas como obesidade, lipodistrofia, ou até mesmo problemas metabólicos sistêmicos (CREWE; AN; SCHERER, 2017).

1.2 – Sistema imune associado ao tecido adiposo

O tecido adiposo tem importante papel como reservatório de células do sistema imune e conecta estas células a outros órgãos e tecidos. As adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo são capazes de promover o recrutamento de uma gama de células do sistema imunológico para o tecido. Estas populações podem ser de diferentes subtipos e variam conforme a condição metabólica e microambiente. Em condições de homeostase, os tecidos adiposos abrigam uma grande parcela de células mononucleares, principalmente macrófagos do perfil M2, células T reguladoras e células do perfil 2 de resposta imune, incluindo linfócitos Th2, células linfoides inatas (ILCs) do tipo 2 e eosinófilos (MAHLAKÖIV et al., 2019; VILLARROYA et al., 2018).

Os macrófagos do tecido adiposo têm funções ímpares no controle e homeostase tecidual, sendo a maioria de perfil M2. Estes macrófagos são alternativamente ativados por citocinas como IL-4, IL-10 ou TGF- β , e característicos pela expressão de moléculas como CD206, CD301a, CD163, arginase, e Retnla/Fizz1 (ORECCHIONI et al., 2019; SILVA et al., 2019). Os macrófagos variam em relação ao tipo de tecido adiposo e condição metabólica do tecido, como demonstrado por SILVA et al. Macrófagos presentes em tecidos de animais obesos tendem a ter seu perfil de resposta modificado, uma vez que a inflamação crônica do tecido adiposo faz com que estas células passem a produzir mais citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e promove a polarização destas células para um perfil M1, caracterizado pelo aumento na expressão de moléculas como CD80/86, MHC-II, iNOS e IL-1R (ORECCHIONI et al., 2019). Monócitos indiferenciados que chegam a um tecido adiposo inflamado também passam a apresentar um perfil inflamatório, com alta expressão de Ly6C e de MHC-II, se diferenciando mais tarde em macrófagos teciduais do perfil M1. Além

Introdução

dos macrófagos, outro tipo celular mononuclear de grande importância nos tecidos adiposos são as células dendríticas (MACDOUGALL et al., 2018). No mesentério, por exemplo, estas células são capazes de migrar pelo tecido adiposo, via vasos linfáticos, após serem ativadas no intestino e irem até o linfonodo mesentérico, para apresentação antigênica. Da mesma forma, em outros tecidos de barreira como o pulmão, o tecido adiposo mediastinal representa importante papel conectivo das células do tecido com seus respectivos órgãos linfoides secundários.

Seguindo os macrófagos, temos no tecido adiposo presença abundante de linfócitos B e T. Na maioria dos tecidos adiposos viscerais, as células linfoides apresentam uma organização peculiar em estruturas que recebem o nome de tecido linfoide associado à gordura – FALCs (do inglês, *fat-associated lymphoid clusters*) (CRUZ-MIGONI; CAAMAÑO, 2016; KAMINSKI; RANDALL, 2010). Recentemente, foi demonstrada a presença de células de memória contra antígenos intestinais, residentes no tecido adiposo mesentérico (HAN et al., 2017). No tecido adiposo em homeostase, vigora um perfil de células T reguladoras (FoxP3⁺), importantes na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , e também há abundância de células de perfil Th2 (GATA-3⁺), que desempenham importante papel na polarização dos macrófagos M2 presentes neste tecido através da produção de IL-4 e IL-13 (MAHLAKÖIV et al., 2019). Estas células, através da produção de citocinas do tipo 2, como IL-5, são as responsáveis por manter também o tônus de eosinófilos no tecido. Além disso, as células B residentes no tecido adiposo são responsáveis pela produção em alta taxa de anticorpos naturais, sendo caracterizadas como células B do tipo 1. Estas células produzem anticorpos IgM de baixa afinidade que são secretados nas cavidades e ajudam a promover a opsonização de microrganismos e antígenos que possam atravessar as barreiras teciduais. Estas células podem ser identificadas pela presença de marcadores como CD11b e CD5 (WORTIS, 2017). Adicionalmente, algumas destas células conseguem produzir com eficiência citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que ajudam na promoção de um perfil anti-inflamatório nestes locais (WU et al., 2019).

Outras células da imunidade inata têm papel importante na manutenção da homeostase do tecido adiposo. Este tecido abriga diversas populações relacionadas ao padrão de resposta Th2, como eosinófilos e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2). Os eosinófilos estão presentes no tecido em quantidades razoáveis na condição

homeostática. Estas células são recrutadas ao tecido adiposo através de citocinas produzidas pelas células Th2 e ILC2, como IL-5 e IL-13. Porém, num contexto inflamatório, são substituídas por um infiltrado neutrofílico e monocítico. As ILCs, por sua vez, apresentam perfis de resposta muito similares à resposta de células T CD4⁺, porém não dependem de sinalização antigênica via TCR para sua ativação. Também apresentam maior plasticidade em relação às células T (EBERL et al., 2015). Elas são importantes produtoras de citocinas no tecido adiposo, e assim como as células T auxiliam no recrutamento celular e *homing* de células hematopoiéticas para o tecido adiposo. São caracterizadas em subtipos de acordo com as citocinas que produzem e os fatores de transcrição que expressam. As ILC1 são identificadas pela expressão do fator de transcrição Tbet, e estão relacionadas a imunidade do tipo 1 nestes tecidos. São importantes produtoras de TNF- α e IFN- γ . Já as ILC2 expressam o fator de transcrição GATA-3, e produzem citocinas do padrão 2 de resposta imune, como IL-13, IL-4 e IL-5, e correspondem ao subtipo mais prevalente no tecido adiposo. As ILC3 são caracterizadas pela expressão de ROR γ t, e são responsáveis pela produção de citocinas como IL-17 e IL-22, estando presente em grande quantidade no intestino, por exemplo, mas não no tecido adiposo (EBERL et al., 2015).

Algumas células são vistas em maior número nestes tecidos somente em contextos de inflamação. Os neutrófilos, por exemplo, podem aumentar em número e proporção em distúrbios metabólicos e na obesidade, ou mesmo em infecções que acometam tecidos adiposos e órgãos associados, como intestino (FONSECA et al., 2015; KAMINSKI; RANDALL, 2010). O recrutamento destas células ocorre devido ao aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 e HMGB1.

1.3 – Mecanismos de controle e homeostase do tecido adiposo

Por se tratar de um tecido com alta plasticidade e estar submetido a variações constantes no armazenamento de lipídios e gasto energético, várias vias devem atuar sobre o tecido adiposo afim de controlar a homeostase celular e metabólica do tecido. Caso alguma destas vias de controle esteja desregulada, se dá origem aos distúrbios metabólicos. Obesidade, diabetes, distúrbios cardiovasculares e metabólicos são geralmente caracterizados como doenças complexas, porque possuem etiologias multifatoriais que incluem uma combinação de fatores genéticos e ambientais

Introdução

(AHMAD; AHLUWALIA, 2019; GRUNDY, 2004). Considerando os problemas vistos em países emergentes, a globalização e difusão da dieta ocidental, os problemas relativos a um desbalanço homeostático do tecido adiposo têm se mostrado mais evidentes nas populações de países desenvolvidos ou em desenvolvimento.

Várias vias contribuem para o controle homeostático neste tecido. O SNC, por exemplo, é um dos principais alvos da sinalização de adipocinas produzidas no tecido adiposo, como a leptina, e responde a estes estímulos com a produção de outros hormônios, regulação da temperatura corporal, ou liberação de neurotransmissores (BEALL; HANNA; ELLACOTT, 2017; FORNY-GERMANO; DE FELICE; DO NASCIMENTO VIEIRA, 2019). Porém, é o sistema nervoso periférico que desempenha as mais importantes funções aferentes, especialmente o SNA. Muitos trabalhos descrevem o papel do sistema nervoso simpático no controle do tecido adiposo. A sinalização noradrenérgica é importante no controle da termogênese e geração de energia na forma de calor no tecido, além de regular a formação dos depósitos de lipídio; porém, pouco é sabido sobre inervação parassimpática nestes tecidos e como esta via ajuda a controlar a homeostase imunológica tecidual. (BARTNESS et al., 2014). Recentemente, foco tem sido dado também ao fato de as células do sistema imune presentes nestes tecidos serem capazes de responder a estes neurotransmissores através da presença de receptores de membrana, e até mesmo produzir estas moléculas para sinalização parácrina (FRANCO et al., 2007).

A produção de hormônios como insulina e glucagon pelo pâncreas são também grandes reguladores desta resposta energética do tecido adiposo. O glucagon é responsável direto pelo catabolismo de ácidos graxos nos adipócitos para geração de energia, e a produção de insulina promove o anabolismo do tecido e aumento dos depósitos energéticos. O próprio tecido adiposo também é capaz de se autorregular, pela produção de hormônios e adipocinas que sinalizam de maneira autócrina, parácrina ou endócrina. Adiponectina, apelina e quemerina são exemplo de moléculas produzidas em nível local, que tem ação no próprio tecido (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Mudanças na morfologia celular e acúmulo ou quebra de lipídios desregulados nos adipócitos, causados por variações na dieta e fatores genéticos, podem levar ao desbalanço na produção de hormônios e moléculas sinalizadoras por estas células.

Introdução

Além do controle hormonal e neural, o controle do tônus tecidual do tecido adiposo realizado pelas células do sistema imune é de extrema importância. Fatores produzidos pelos macrófagos e pelas células fibroblásticas que residem no tecido desde a idade mais tenra, são capazes de recrutar outros tipos celulares e promover a correta estruturação imunológica do tecido, auxiliando na formação das FALCs e regulando o tônus imunológico basal do tecido (MRAZ; HALUZIK, 2014). Isso se dá pela produção de citocinas de recrutamento celular pelas células fibroblásticas, como a IL-33 (MAHLAKÖIV et al., 2019), ou citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10, que auxiliam na polarização dos padrões de resposta das células que chegam a esse tecido. A interferência na homeostase do tecido adiposo na obesidade, por exemplo, se dá principalmente pelo fato de que o desbalanço metabólico, que leva ao aumento da produção de adipocinas e mediadores nos adipócitos, pode influenciar a produção de citocinas e quimiocinas pelas células residentes. A produção dos mediadores inflamatórios recruta mais células para o tecido, que produzem mais mediadores inflamatórios, e assim inicia-se um ciclo vicioso (LU et al., 2019).

A inflamação crônica e gradual deste tecido causada pela obesidade se manifesta numa condição que conhecemos como *low grade inflammation*, ou inflamação crônica de baixo grau. Essa condição é predisponente a um dos principais fatores de distúrbios metabólicos associados à obesidade, a chamada “meta-inflamação”, que significa inflamação crônica observada em nível local e sistêmico. Essa inflamação não é restrita apenas ao tecido adiposo, mas abrange outros órgãos e tecidos (PAOLICELLI; ANGIARI, 2019). Assim sendo, o sistema imunológico contribui ativamente para a patogênese de doenças crônicas, em particular a síndrome metabólica (BÉNÉZECH et al., 2015; KAMINSKI; RANDALL, 2010).

A síndrome metabólica se caracteriza como um conjunto de comorbidades decorrentes do estilo de vida ocidental ou condições genéticas. A manifestação de pelo menos 3 destas comorbidades se caracteriza como síndrome metabólica: resistência à insulina; aumento da gordura visceral/abdominal; dislipidemia; aumento do colesterol LDL e hipertensão arterial (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2016; KASSI et al., 2011). Essa síndrome aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas, derrame e diabetes do tipo 2. A síndrome metabólica possui relação estreita com a condição metabólica do tecido adiposo, e a inflamação crônica neste tecido predispõe ao seu aparecimento. Já é sabido, por exemplo, que o aumento da

produção de TNF- α nos tecidos adiposos está intimamente ligada a obesidade, e leva à resistência à insulina, uma das condições que caracteriza a síndrome metabólica (HOTAMISLIGIL et al., 1995). Outras adipocinas e citocinas produzidas no tecido adiposo, como leptina, IL-6 e proteína C reativa também já foram relacionadas à resistência à insulina e hiperglicemia (EMAMALIPOUR; ESFAHLAN, 2019; WISSE, 2004). Dessa forma, entender os mecanismos de regulação da resposta imunológica neste tecido é importante para entendermos a patogênese de distúrbios metabólicos.

1.4 – O sistema nervoso autônomo e o controle da resposta imune

Os tecidos adiposos podem receber inervação direta do sistema nervoso periférico, especialmente do autonômico. O SNA é o principal regulador das funções biológicas involuntárias, e é capaz de promover as respostas conhecidas como “luta ou fuga” (do inglês, *fight-or-flight*) ou “descanso e digestão” (do inglês, *digest-or-rest*). Esse componente periférico do sistema nervoso é constituído por duas principais vias de sinalização: sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (FURNESS, 2006). Ambos se caracterizam por um sistema de sinalização que envolve um neurônio pré-ganglionar e um pós-ganglionar, e a região onde ambos se encontram é denominada gânglio. A sinapse ganglionar, tanto no sistema nervoso simpático quanto parassimpático, é mediada pela acetilcolina (ACh). A diferença entre os dois sistemas é a liberação do neurotransmissor que ocorre no neurônio pós-ganglionar, que pode ser feita via ACh, o que caracteriza o sistema nervoso parassimpático, ou via noradrenalina (NA) / adrenalina (Adr), que caracteriza o sistema nervoso autônomo simpático. Isso promove os dois diferentes fenótipos do sistema nervoso autônomo, muitas vezes antagônicas entre si, mas complementares. A sinalização destes sistemas é importante para a manutenção das atividades fisiológicas basais, como controle das atividades peristálticas, broncodilatação ou broncoconstrição, controle respiratório, controle da atividade urinária e de esfíncteres, contração e relaxamento da musculatura lisa, entre outras (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016).

A presença de fibras do sistema nervoso autônomo varia de acordo com o tipo de tecido adiposo. Nos tecidos adiposos marrons e tecidos adiposos brancos parietais, há alta densidade de fibras simpáticas, responsáveis por controlar a homeostase energética e produção de calor (BARTNESS et al., 2014; MORRISON;

Introdução

MADDEN; TUPONE, 2012; ZHU et al., 2019). Já no tecido adiposo visceral, existe a presença de várias fibras parassimpáticas, em especial mediadas pelo nervo vago. Isso ocorre especialmente por estes tecidos servirem de caminho para inervação das vísceras abdominais e torácicas, como o intestino (COFFEY; WALSH, 2020). No entanto, até hoje, permanece pouco esclarecido o papel que estas fibras parassimpáticas desempenham diretamente no tecido adiposo e FALCs, e durante muito tempo acreditou-se que elas não poderiam exercer controle direto sobre eles (GIORDANO et al., 2006; KREIER et al., 2002; KREIER; BUIJS, 2007).

As células da resposta imunológica residentes no tecido adiposo expressam diversos receptores para os neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, incluindo receptores para ACh e NA/Adr (COX et al., 2020; MARTELLI; MCKINLEY; MCALLEN, 2014; QIU; YUPING; JIANHE, 1996; ZDANOWSKI et al., 2015). A sinalização via ACh ou NA/Adr ocorre via receptores ionotrópicos (canais) ou metabotrópicos (relacionados à proteína G). A ACh consegue exercer sua função agindo em dois tipos de receptores: nicotínicos, ou muscarínicos. Os receptores nicotínicos são canais iônicos, que são nomeados de acordo com as subunidades que o constituem, α ou β . Já os muscarínicos são receptores acoplados à proteína G, e podem ser de 5 tipos diferentes: M1, M2, M3, M4 ou M5. A NA/Adr possui duas famílias de receptores acoplados à proteína G: alfa e beta adrenérgicos, sendo estes subdivididos em $\alpha 1$ e $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (VENTURA et al., 2010).

Além da interferência tecidual direta pela inervação, hoje se sabe que outros tipos celulares além dos neurônios são capazes de produzir neurotransmissores. Recentemente, trabalhos descreveram a importância de células do sistema imune na produção destas moléculas. Essa liberação parácrina de neurotransmissores serviria não apenas para promover a comunicação entre células do sistema imune e sistema nervoso, mas poderia também servir como via de regulação entre as próprias células do sistema imune (KERAGE et al., 2019). Entre os neurotransmissores produzidos pelas células do sistema imunológico, estão ACh, dopamina, glutamato e serotonina (FRANCO et al., 2007). Já em 1995, se sabia que as células da resposta imunológica eram capazes de sintetizar ACh pela presença da enzima colina acetiltransferase (ChAT) (FUJII et al., 1995). Hoje, se sabe que essa produção se dá principalmente pelas células T CD4+, principalmente as células em estado de ativação (FUJII et al., 2017a; KAWASHIMA; FUJII, 2003). Da mesma forma, já foi demonstrado que estas

Introdução

células são capazes de produzir a enzima Tirosina Hidroxilase (TH) (COSENTINO et al., 2007). Essa enzima é relacionada à produção de catecolaminas, incluindo noradrenalina/adrenalina e dopamina.

É importante frisar que as células da resposta imunológica produzem também outros neurotransmissores não relacionados à resposta autonômica; elas também são capazes de sintetizar e liberar outras classes de neurotransmissores. Um neurotransmissor relacionado à ativação de células T é a serotonina (5-HT). Alguns trabalhos sugerem que a 5-HT pode atuar como um fator autócrino durante a ativação de células T naïve para melhorar sua função (GORDON; BARNES, 2003; LEÓN-PONTE; AHERN; O'CONNELL, 2007). Há também descrição da produção de glutamato pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), de forma a melhorar o sinal de ativação das células T (PACHECO et al., 2006). O glutamato sinaliza através de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR1 e mGluR5) expressos por células T, e pode interferir na sua proliferação. Dessa forma, a liberação de neurotransmissores ocorre não apenas pela inervação direta, mas estes também podem ser provenientes das células da resposta imune presentes neste microambiente.

1.5 – Sinalização colinérgica e atividade anti-inflamatória

Dentre os neurotransmissores relacionados ao sistema nervoso central e autônomo, certamente a ACh é a molécula mais abundante no organismo, responsável pelas principais vias de sinalização. De forma interessante, foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado. A sua descoberta ocorreu em 1914, pelo cientista Henry Hallett Dale (DALE, 1914). Posteriormente, seus achados foram corroborados por Otto Loewi na década posterior (LOEWI, 1921; ZIMMER, 2006). A ACh é um éster de ácido acético e colina, e possui funções importantes como neurotransmissor central e periférico, vasodilatadoras, bronco-constritoras, agonista muscarínico e nicotínico, hormonais, entre outras. Está presente tanto nos seres humanos quanto em outros membros do reino animal. A sua sinalização, como dita anteriormente, se dá principalmente por duas classes principais de receptores: nicotínicos (ou ativados pela nicotina; nAChR) e os muscarínicos (ou ativados pela muscarina; mAChR). Enquanto os receptores nicotínicos são canais iônicos, os muscarínicos são receptores

Introdução

metabotrópicos, ou acoplados à proteína G. A frequência destes receptores varia conforme a população celular, seja de origem neuronal ou não-neuronal.

A fração não-neuronal que expressa receptores para ACh corresponde também às células da resposta imune. A quantidade e qualidade dos receptores para acetilcolina nas células da resposta imunológica varia de acordo com o tipo celular e seu estado basal, podendo se alterar em um estado de repouso ou ativação (DUSTIN; COLMAN, 2002). Já foi mostrado que macrófagos e linfócitos de camundongos expressam níveis muito mais elevados de nAChR do que as células dendríticas; além disso, algumas subunidades também são expressas somente em algumas populações específicas, como a $\alpha 4$ em macrófagos ou a $\alpha 9$ em linfócitos (QIAN et al., 2011). Em células T naïve, as cadeias $\beta 1$ e $\beta 2$ são as subunidades de receptores nicotínicos mais expressas. Porém, após ativação *in vitro*, o padrão de expressão muda, e $\alpha 4$, $\alpha 7$ e $\alpha 4$ tornam-se altamente expressos nas células T CD4, e $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\beta 4$ aumentam nas células T CD8. Além disso, a polarização para um padrão de resposta celular interfere na variabilidade de expressão dos receptores por estas células. Células T CD4 + polarizadas para a linhagem Th2 mostram maior indução de $\alpha 4$ do que células Th1 ou Th17 (QIAN et al., 2011). As células do sistema imune também expressam receptores muscarínicos de ACh (mAChR). Em relação às células T, as células não ativadas tendem a expressar maiores concentrações de M3 e M4 em relação às células ativadas. Após ativação *in vitro*, esse padrão de expressão muda para uma grande expressão do receptor M1, tanto nas células T CD4 quanto nas CD8. De forma similar, os mAChR variam entre os diferentes padrões de resposta, com M1 e M5 altamente expressos por células Th2 e grande expressão de M4 em células Th1 (QIAN et al., 2011). A expressão destes receptores também já foi confirmada em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas.

Além da presença de receptores colinérgicos nas células do sistema imune, hoje é sabido que elas também são capazes de produzir ACh. Através da utilização de animais repórter, pesquisadores conseguiram identificar a presença de ACh nas células do sistema imunológico na década passada (TALLINI et al., 2006). Hoje sabemos que, especialmente os linfócitos T e B, são células capazes de produzir ACh e controlar o microambiente no qual estão inseridas por sinalização parácrina (COX et al., 2020). Além disso, é sabido que células ativadas e com maior expressão de CD44 tendem a expressar maiores níveis de ACh (COX et al., 2019; REARDON et al.,

Introdução

2013). A liberação de ACh pelas células imunes parece ser regulada de forma diferente que ocorre nos neurônios. *In vitro*, células T CD4 de camundongos podem liberar ACh quando seus receptores adrenérgicos $\beta 2$ são ativados (ROSAS-BALLINA et al., 2011). *In vivo*, essa via fornece um elo pelo qual o sistema nervoso pode influenciar diretamente as células T; isto é, neurônios estimulados produzem NE que se liga a receptores β -adrenérgicos nas células T CD4 no baço e estimula sua liberação de ACh. A ativação *in vitro* do TCR dessas células também aumenta a quantidade de ACh detectada nos sobrenadantes de cultura. Curiosamente, ao contrário das células T, as células B que expressam ChAT não produzem ACh detectável em resposta ao tratamento com NA *in vitro* (REARDON et al., 2013).

No início dos anos 2000, Kevin Tracey e colaboradores descreveram a atuação da sinalização colinérgica no controle da inflamação sistêmica. A este mecanismo, foi dado o nome de via anti-inflamatória colinérgica (BOROVIKOVA et al., 2000). O grupo percebeu que a ACh, principal neurotransmissor liberado pelo nervo vago, atenuou significativamente a liberação *in vitro* de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18 em macrófagos, mas não alterou os níveis de IL-10 nestas mesmas células após estímulo por lipopolissacarídeos (LPS). Além disso, ao estimular diretamente o nervo vago na periferia a morte após administração sistêmica de endotoxina era inibida em ratos, atenuando a produção de TNF- α sistêmica e prevenindo o choque séptico. De forma antagônica, o bloqueio da sinalização colinérgica nos animais, através de cirurgia de vagotomia cervical bilateral, promovia aumento da produção de TNF- α sistêmico pelos animais. Além disso, já havia sido descrito em 1996 por YIHUA et al, que a utilização de hemicolinio-3 no ventrículo lateral de ratos, um inibidor da síntese de ACh, promovia aumento da produção de anticorpos no baço. Isso também era visto utilizando-se atropina, um antagonista muscarínico (YIHUA; PENG; WANG, 1996).

Em sua descrição, a via anti-inflamatória exerce sua atividade sobre as células do sistema imunológico através dos receptores $\alpha 7$ nicotínicos - nAChR $\alpha 7$ (TRACEY, 2002, 2005). Segundo a teoria, a ligação da ACh a receptores $\alpha 7$ nicotínicos é capaz de bloquear vias de sinalização como a via do NF- κ B. O bloqueio dessas vias impede a liberação de TNF- α , HMGB1, IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias. Como a atividade dessa via é controlada por sinais neurais, ela fornece um caminho para o cérebro regular a resposta de citocinas de maneira localizada, controlada e específica

para um órgão. Além de inibir a sinalização via NF- κ B, a ligação da acetilcolina a receptores nicotínicos estimula o caminho anti-inflamatório JAK3-SOCS3.

As atividades anti-inflamatórias da via foram descritas em tecidos como baço e fígado. Porém, a atividade da sinalização da ACh no tecido adiposo e regulação da resposta imune é ainda desconhecida. Como o funcionamento da via é intrinsecamente ligado ao nervo vago, que por sua vez está relacionado intimamente à inervação parassimpática visceral, abdominal e torácica, é alta a probabilidade de que esta via exerça importante atividade nos tecidos adiposos viscerais. Da mesma maneira, a ACh livre na corrente sanguínea pode agir sobre tecidos periféricos, ajudando a promover a homeostase tecidual e controle das células imunes do tecido. Neste sentido, estudos que avaliem o papel da ACh sobre a homeostase do tecido adiposo ainda são escassos. Considerando o impacto da sinalização colinérgica no controle das respostas imunológicas, hipotetizamos que o tônus de ACh liberado em nível tecidual possa ter impacto na manutenção da homeostase metabólica e imunológica no tecido adiposo visceral.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar o efeito que o tônus colinérgico exerce sobre a homeostase imunológica e metabólica no tecido adiposo branco.

2.2 – Objetivos específicos

Objetivo específico 1 – Analisar o efeito da redução do tônus colinérgico em animais VACht KD^{HOM} sobre as células do sistema imune presentes em diferentes compartimentos de tecido adiposo branco.

Objetivo específico 2 – Determinar o efeito da inibição farmacológica de receptores nAChR para o sistema imunológico residente no tecido adiposo.

Objetivo específico 3 – Determinar os efeitos da ablação parassimpática pelo nervo vago, através de vagotomia unilateral, no perfil de células residentes no tecido adiposo e seu perfil metabólico.

Objetivo específico 4 – Analisar o perfil metabólico de animais com redução do tônus colinérgico, submetidos a dieta hiperlipídica.

Objetivo específico 5 – Analisar o efeito da redução do tônus colinérgico em animais VACht KD^{HOM} e vagotomizados sobre o desenvolvimento de síndrome metabólica.

Objetivo específico 6 – Caracterizar a inervação colinérgica entre diferentes depósitos de tecido adiposo e a produção de ACh pelas diferentes populações celulares.

3. Materiais e Métodos

3.1 – Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade de 6 semanas ao início dos experimentos, obtidos do biotério de criação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Para os experimentos envolvendo os camundongos VACht KD^{HOM}, fêmeas, com idade de 6-8 semanas ao início dos experimentos, foram obtidas em colaboração com a Profa. Dra. Carla Máximo Prado (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP). Os animais VACht KD^{HOM} possuem redução na expressão da vesícula transportadora de acetilcolina para a fenda neuronal (VACht, do inglês, *vesicular acetylcholine transporter*). Desta maneira, estes animais disponibilizam apenas cerca de 35% da ACh que é produzida pelos neurônios, reduzindo a sinalização colinérgica em todos os locais do organismo (PRADO et al., 2006). Animais Chat *Cre-TdTomato* com 4 semanas foram fornecidos pelo Prof. José Donato Junior (Departamento de Fisiologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP). Estes animais possuem um gene *reporter* para proteína fluorescente vermelha (RFP, do inglês, *red fluorescent protein*) na região codificante da enzima ChAT, apresentando fluorescência na faixa de comprimento de onda visível $\approx 550\text{nm}$. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, protocolo nº 49/2016. A eutanásia dos animais foi realizada por inoculação de sobredose de anestésico (300 mg/kg cetamina + 30 mg/kg xilasina) por via intraperitoneal (I.P). Os animais, tanto em dieta controle quanto obesos, foram eutanasiados entre 20 e 24 semanas após o início dos experimentos.

3.2 – Tratamento com agonista e antagonista colinérgico

Para os experimentos envolvendo a inibição farmacológica da via colinérgica, foi utilizada mecamilamina (do inglês, *2- (Methylamino) isocamphane hydrochloride* - C₁₁H₂₁N · HCl) (Sigma-Aldrich - Merck KGaA, San Louis, Missouri, EUA). A

mecamilamina é um antagonista não seletivo e não competitivo dos receptores de acetilcolina nicotínicos. O cloreto de mecamilamina foi solubilizado em salina e acondicionado a -20°C em solução, que era preparada em período próximo ao uso. Para isto, os animais foram tratados I.P., em dias alternados, durante quatro semanas, na concentração de 1 mg/kg. O grupo controle foi tratado somente com salina. Nos experimentos envolvendo animais obesos, a nicotina, agonista nAChR, também foi utilizada. Para isso, a nicotina (do inglês, *nicotine hydrogen tartrate salt* - C₁₀H₁₄N₂ · 2C₄H₆O₆) (Sigma Aldrich) foi solubilizado em salina e acondicionado a -20° em solução. A concentração, via de administração e período de tratamento obedeceu ao citado anteriormente com a mecamilamina (1 mg/kg – I.P. – dias alternados). O grupo controle foi tratado com salina.

3.3 – Cirurgia de vagotomia unilateral

Os camundongos C57BL/6 foram submetidos à cirurgia de vagotomia unilateral direita na sua quarta semana de vida, ao início dos experimentos. Os animais receberam por via intramuscular o pré-anestésico acepromazina (3 mg/kg), e após relaxamento muscular receberam o anestésico por via intraperitoneal (100 mg/kg cetamina e 10 mg/kg xilasina). Para o procedimento cirúrgico, os animais foram imobilizados dorsoventralmente numa cama cirúrgica, que impedia os movimentos na região superior e cabeça. Logo após, a região direita logo abaixo do pescoço foi seccionada, e as camadas musculares separadas com a ajuda de uma pinça cirúrgica, até permitir a visualização do nervo vago, ao lado da artéria carótida comum e da veia jugular, que foi seccionado nos animais vagotomizados e mantido íntegro nos animais do grupo controle *Sham*. Os animais vagotomizados apresentaram no dia posterior à cirurgia o sinal de lesão do nervo vago, que se caracteriza por flacidez da pálpebra do mesmo lado onde houve a secção. Os animais foram mantidos em observação por 3 dias após a cirurgia e alimentados com ração umedecida dentro da gaiola (trocada diariamente).

3.4 - Dieta hiperlipídica e indução de obesidade

Em parte dos experimentos, foi utilizada dieta hiperlipídica (HFD, do inglês, *high fat diet*) a base de gordura animal (60,3 % lipídios, 21,4% carboidratos e 18,3% proteínas) (Rhooster®; São Paulo, Brasil). A constituição da dieta hiperlipídica pode ser vista no Anexo 1. Animais VACht KD ou tratados com mecamilamina foram submetidos a 20 e 15 semanas de dieta hiperlipídica, respectivamente. Os mesmos foram divididos em dieta controle ou HFD, e foram mantidos nestas condições por 20 semanas, sem alteração das dietas. Durante este tempo, os animais foram pesados semanalmente e submetidos a testes metabólicos. Ao final deste período, os animais foram eutanasiados e foram coletados os tecidos adiposos, fígado, pâncreas e soro. Os tecidos foram destinados a análises histológicas e o plasma acondicionado a -80°C para dosagem de metabólitos.

3.5 – Pesagem semanal e testes de tolerância à glicose/insulina

Os animais foram pesados semanalmente, obedecendo sempre a um mesmo dia e horário na semana. Os testes metabólicos para análise de resistência à insulina e de tolerância à glicose foram realizados 15 ou 20 semanas após o início da administração da dieta, de acordo com o experimento. A resposta à insulina foi examinada através do teste de tolerância à insulina (ITT – do inglês, *insulin tolerance test*). Para tal, os animais foram submetidos a jejum *overnight*, e o alimento foi repostado na manhã seguinte, por um período de 2 horas, normalizando assim o horário de ingestão alimentar dos animais. Após o período de alimento disponível, os animais foram postos novamente em jejum por 6 horas. Após esse período, foi injetado intraperitonealmente 0,75 U/Kg de insulina. Para avaliar a resposta à glicose, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam por gavagem 2 g/Kg de glicose (GTT- do inglês, *glucose tolerance test*). Em ambos os testes foi analisada a capacidade metabólica dos animais por meio da dosagem das concentrações séricas de glicose, analisada nos tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 90 e 120 min, ou 0, 5, 10, 15, 30, 90, 120 min após a inoculação da insulina ou glicose, respectivamente.

3.6 – Análise da distribuição de gordura corpórea

Para avaliar a distribuição corpórea da gordura nos animais obesos, os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina e expostos ao sistema *In-Vivo Imaging System* FX PRO na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. Foram realizadas duas imagens por animal, utilizando raio X com alta energia (filtro de 0.8mm) e raio X total (sem filtro – 0.0). A sobreposição entre as duas imagens adquiridas gerou uma nova imagem que demonstra os locais de acúmulo de gordura corpórea nos animais. As medições foram realizadas com o auxílio do Dr. Walter Miguel Turato (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP). A relação entre a massa magra e massa gorda dos animais também foi aferida por ressonância magnética, através do aparelho *Magnet NMR Minispec mq* (Bruker™; Billerica, Massachusetts, EUA). A quantidade em gramas e na proporção de massa magra e massa gorda foi calculada a partir do peso dos animais em dieta CHOW ou HFD. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. José Donato Júnior, no Departamento de Fisiologia – ICB I /USP.

3.7 – Análise do perfil metabólico dos animais

Animais em dieta controle ou HFD foram submetidos à avaliação do metabolismo por análises de calorimetria, através do aparelho CLAMS HC (do inglês, *Comprehensive Lab Animal Monitoring System for HOME CAGES*) (Columbus Instruments; Columbus, Ohio, EUA). Os animais ficaram acondicionados por uma semana, em caixas individuais. Durante este tempo, o equipamento aferiu o VO₂ em cada caixa, parâmetro que indica o metabolismo de carboidrato destes animais. Além disso, dados como movimentação, atividade ambulatoria e ingestão de água foram obtidos. As análises dos animais VACht KD foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. José Donato Júnior, no Departamento de Fisiologia – ICB I, e as análises dos animais submetidos à cirurgia de vagotomia unilateral foram realizadas com o Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara, no Departamento de Imunologia – ICB IV.

3.8 – Tratamento com 2-NBDG e Bodipy

Para avaliar o metabolismo basal das células residentes no tecido adiposo, animais WT ou VACht KD^{HOM} foram submetidos a teste de a captação de glicose ou de lipídios in vivo. Para a avaliação da captação de glicose, os animais receberam 30min antes da eutanásia uma injeção intraperitoneal de 100µg de 2-NBDG (do inglês, *2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino] -D-glucose*) (Invitrogen™; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA). Essa molécula corresponde a glicose conjugada com uma molécula fluorescente, que pode ser rastreada após captação pela célula. O experimento envolvendo a captação de lipídios foi feito após injeção intraperitoneal de 50µg de Bodipy (do inglês, *4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacene*) (Invitrogen™). As drogas foram diluídas em tampão PBS para administração (200µl de volume final). Após 60 min, os animais foram eutanasiados, e a fração estromal do mesWAT e scWAT foi analisada por citometria de fluxo.

3.9 – Processamento dos tecidos e extração celular

Para avaliação das populações celulares, o tecido adiposo mesentérico (do inglês, *mesenteric white adipose tissue*, mesWAT), tecido adiposo subcutâneo (do inglês, *subcutaneous white adipose tissue*, scWAT), linfonodo mesentérico (do inglês, *mesenteric lymph node*, mLN), baço e íleo foram processados para análise do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo. Para processamento de células do baço, o órgão foi macerado, a suspensão celular foi filtrada em *cell Strainer* (BD-Biosciences; Becton, Dickinson and Company; East Rutherford, New Jersey, EUA), e as hemácias foram lisadas com o auxílio de tampão ACK (Invitrogen™). As células foram lavadas em meio RPMI-completo (Sigma Aldrich - Merck KGaA, San Louis, Missouri, EUA), contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) (LGC biotecnologia; Cotia, São Paulo, Brasil), penicilina/estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), L-Glutamina (Hyclone) e β-Mercaptoetanol (Gibco™; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Para o mesWAT e scWAT, utilizou-se protocolo conforme descrito em FONSECA et al., 2015. Resumidamente, o tecido adiposo foi coletado (após perfusão corpórea com tampão fosfato-salino – PBS (do inglês *phosphate-buffered saline*) -

gelado) e digerido com 0,50 mg/mL de Colagenase IV (Sigma-Aldrich - Merck KGaA, San Louis, Missouri, EUA) e 0,25 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) em meio DMEM (Corning Inc.; Nova York, EUA) contendo 1% de albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin - BSA low fat*) tamponado com HEPES. Após digestão e inibição das enzimas por adição de 0,5mM de EDTA, as células foram ressuspensas em meio RPMI- completo. Quanto aos linfonodos mesentéricos, fizemos a digestão destes tecidos para análise da fração estromal. Os linfonodos foram coletados e digeridos com 0,50 mg/mL Colagenase IV (Sigma-Aldrich) e 0,25 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) em meio RPMI incompleto. Após digestão por 20min a 37°C e inibição das enzimas por adição de meio RPMI com 3% de SFB e 0,5mM de EDTA, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI- completo a 3% (SFB).

As células da lâmina própria intestinal do íleo foram obtidas de acordo com protocolo previamente padronizado (FONSECA et al., 2015). Para tal, o intestino foi coletado e lavado em tampão PBS; as células intraepiteliais foram removidas por meio de agitação manual vigorosa em meio RPMI (Sigma-Aldrich) com EDTA 0,5mM (LGC Biotecnologia); depois foi transferido para meio de pré-digestão com 5mM EDTA e 0,145 mg/mL de DTT (Sigma-Aldrich), e finalmente o tecido foi digerido com 0,75 mg/mL de Colagenase IV (Sigma-Aldrich) e 0,5 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich). As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino-SFB (LGC Biotecnologia) e penicilina/estreptomicina (Hyclone).

3.10 – Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Após a extração das populações celulares, foram feitas marcações para análises de células do sistema imune inato (neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos e monócitos, células NK, células linfoides inatas) e análise do infiltrado linfocitário (linfócitos T CD4 e T CD8, linfócitos B, linfócitos TCR $\gamma\delta$), além da avaliação do perfil de produção de citocinas por essas células. Para marcação extracelular, as células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços e o volume completado para 200 μ L com tampão HBSS (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*) (Hyclone). Em adição a este volume, foi adicionado 10 μ L de suspensão contendo 3000 *beads* fluorescentes para contagem celular (Beckman Coulter®; Brea, Califórnia, EUA). Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 min a

Materiais e Métodos

1600 rpm; antes da marcação com o *mix* de anticorpos, fez-se a marcação com o marcador de viabilidade *Live and Dead* (LD) (Invitrogen™ *Molecular Probes*) em tampão HBSS. A placa foi incubada por 20 min protegida da luz, e após este tempo as células foram lavadas em tampão FACS (PBS + 2% SFB). Após a lavagem, foi adicionado 30 µL de *mix* de anticorpos em tampão FACS por poço, e a placa incubada por 30 min a 4°C/protegido da luz. Após término da incubação, a placa foi lavada por 2x com tampão FACS, e nos casos em que não havia marcação intracelular, partiu-se para a etapa de fixação com paraformaldeído a 2%, por 20 min à temperatura ambiente.

A segunda fração das células (aproximadamente 2×10^6) foi destinado à marcação dos fatores de transcrição. Para a marcação intracelular dos fatores de transcrição, as células marcadas para as moléculas de superfície foram ressuspensas em tampão de fixação (eBioscience™ – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA) – 200 µL/poço e incubadas 30 min a 4°C/protegido da luz. Após incubação, a placa foi lavada com tampão FACS. Depois, lavou-se 2x com tampão de permeabilização celular (*Perm Wash*) (eBioscience™), 200 µL/poço; O *mix* dos anticorpos intracelulares foi ressuspensa nesta mesma solução. Após adição do *mix*, incubou-se a placa por 45 min a 4°C/protegido da luz. Depois da incubação, a placa foi lavada 2x com *Perm Wash* (BD Biosciences) – 200 µL/poço, e ressuspensa em 200 µL de tampão FACS.

Para avaliar o perfil de produção de citocinas, aproximadamente 2×10^6 células extraídas foram pipetadas em uma placa de 96 poços e incubadas com uma solução de estímulo contendo 2,5 µL/mL de *Phorbol myristate acetate* - PMA (Invitrogen™), 2,5 µL/mL de Ionomicina (Invitrogen™), na presença de 1 µL/mL de Brefeldina A (*Stop Golgi*) (BD Biosciences) preparado em meio RPMI completo, por 4 horas antes do procedimento de marcação celular. Após a incubação, as células foram lavadas e incubadas com o *mix* de anticorpos de superfície, 30 min a 4°C/protegidas da luz. Depois da marcação extracelular, as células foram lavadas 2x com tampão FACS, ressuspensas em 50 µL de tampão Citofix/Citoperm (BD Biosciences) e incubadas por 20 min a 4°C, protegidas da luz. As células foram lavadas duas vezes com o tampão *Perm Wash* (BD™ Biosciences). Neste mesmo tampão, foi preparado o *mix* de anticorpos intracelulares. 30 µL/poço do *mix* de anticorpos foram adicionados às amostras, que foram incubadas por 2 h a 4°C, protegido da luz. As células foram

Materiais e Métodos

lavadas por mais duas vezes com tampão Perm Wash (BD Biosciences), uma vez com tampão de FACS, e finalmente, ressuspensas em 100 μ L/poço de tampão de FACS.

Após marcação, as amostras foram adquiridas em citômetro BD LSRFortessa – X20, localizado no Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa – CEFAP, ICB / USP. Os anticorpos monoclonais utilizados são descritos no Anexo 1. Todas as análises de citometria foram feitas com o auxílio do software FlowJo®. Para as estratégias de gate, dentro dos *Singlets*, foram plotadas somente as células vivas (Live and Dead^{neg}; CD45⁺). As estratégias de gate utilizadas para identificação das populações celulares podem ser vistas nas imagens presentes nas Figuras 1, 2 e 3. Para identificação de células mieloides e linfócitos B, as estratégias de gate podem ser observadas na Figura 1. As análises foram feitas a partir da população de células vivas, CD45⁺ (A). Foram identificadas as seguintes populações: linfócitos B (TCR- β ^{neg} CD19⁺); eosinófilos (CD11b⁺ SiglecF⁺ MHC-II^{neg} Ly6C^{neg}); neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺); macrófagos (CD11b⁺ CD64⁺ MHC-II⁺ F4/80⁺ Ly6C^{neg}); monócitos (CD11b⁺ CD64^{neg} MHC-II^{neg} F4/80^{neg} Ly6C⁺); células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺ CD19^{neg} TCR- β ^{neg} SiglecF^{neg} Ly6G^{neg} Ly6C^{neg} CD64^{neg}; CD103⁺ ou CD111b⁺).

A análise das células de origem linfoide (com exceção dos linfócitos B) pode ser vista na Figura 2. As *gates* foram feitas a partir da população de células vivas, CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1). Foram caracterizadas ILCs (Thy1.2⁺ TCR- β ⁻ TCR $\gamma\delta$ ^{neg}), células TCR- β positivas (TCR- β ⁺ TCR $\gamma\delta$ ^{neg} CD4⁺/CD8⁺) e TCR $\gamma\delta$ positivas (TCR $\gamma\delta$ ⁺ TCR- β ^{neg}). Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3. As ILCs foram separadas em: ILC1 (Tbet⁺ GATA-3^{neg} ROR γ t^{neg}), ILC2 (Tbet^{neg} GATA-3⁺ ROR γ t^{neg}), ILC3 (Tbet^{neg} GATA-3^{neg} ROR γ t⁺) e células NK (Tbet⁺ NK1.1⁺ GATA-3^{neg} ROR γ t^{neg}). As células TCR- β CD4⁺ foram caracterizadas como: Th1 (CD8^{neg} Tbet⁺ GATA-3^{neg} ROR γ t^{neg} FoxP3^{neg}); Th2 (CD8^{neg} Tbet^{neg} GATA-3⁺ ROR γ t^{neg} FoxP3^{neg}); Th17 (CD8^{neg} Tbet^{neg} GATA-3^{neg} ROR γ t⁺ FoxP3^{neg}) e Treg (CD8^{neg} Tbet^{neg} GATA-3^{var} ROR γ t^{var} FoxP3⁺). A determinação da produção de citocinas também foi feita dentro da população CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1), como observado na Figura 3. Dentro das populações de ILCs, TCR- β ⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺, foi analisada a produção das seguintes citocinas: IFN- γ , IL-17, IL-22, IL-13 e IL-5. Além disso, a ativação celular foi observada pela expressão de CD44 nestas células. A proliferação celular foi analisada pela marcação de Ki67.

Materiais e Métodos

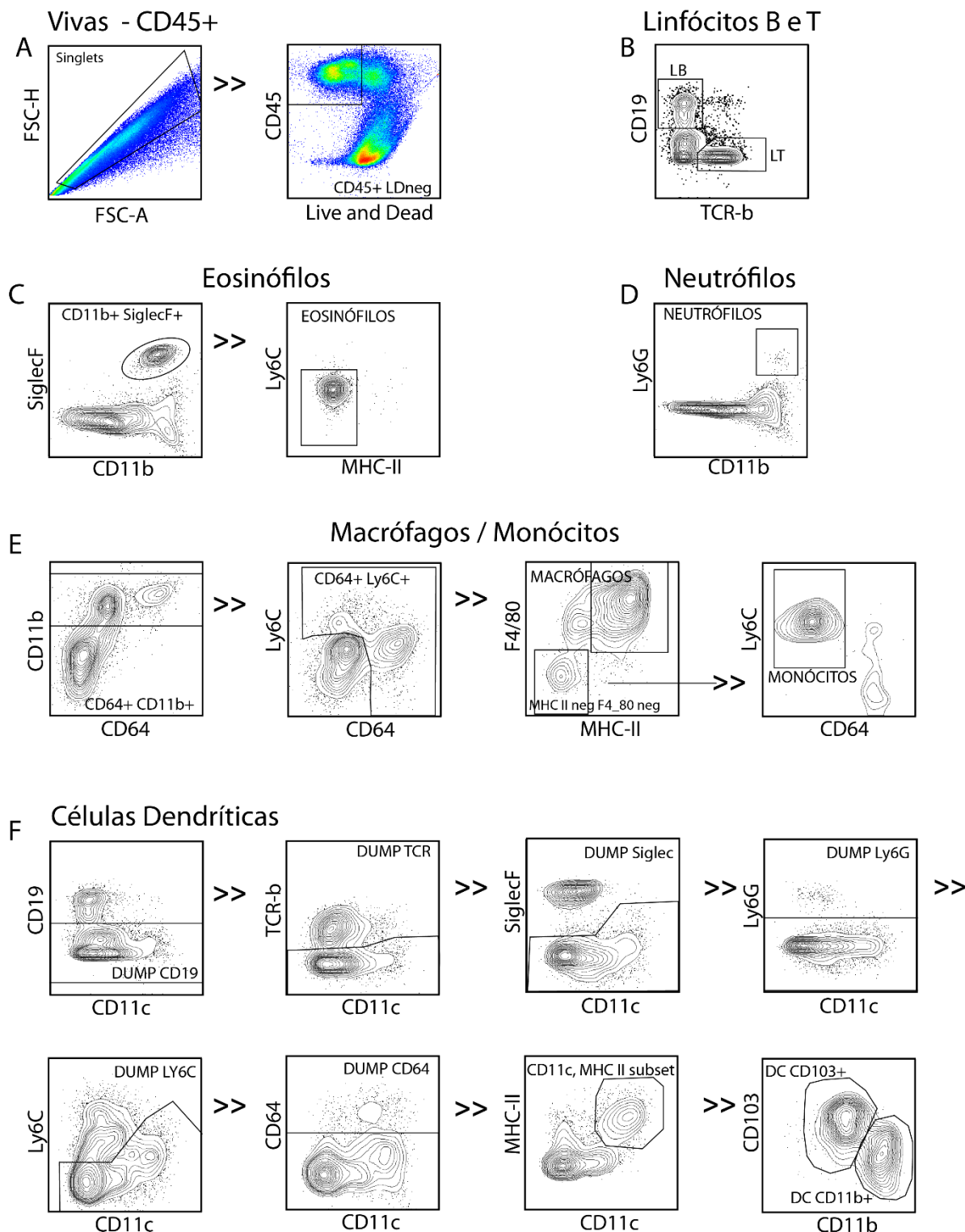


Figura 1– Estratégias de gate para identificação de células linfoides e mieloides.

As análises foram feitas a partir da população de células vivas, CD45⁺ (A). Foram identificadas as seguintes populações: linfócitos B (TCR-β^{neg} CD19⁺); linfócitos T ((TCR-β⁺ CD19^{neg}); eosinófilos (CD11b⁺ SiglecF⁺ MHC-II^{neg} Ly6C^{neg}); neutrófilos (CD11b⁺ Ly6G⁺); macrófagos (CD11b⁺ CD64⁺ MHC-II⁺ F4/80⁺ Ly6C^{neg}); monócitos (CD11b⁺ CD64^{neg} MHC-II^{neg} F4/80^{neg} Ly6C⁺); células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺ CD19^{neg} TCR-β^{neg} SiglecF^{neg} Ly6G^{neg} Ly6C^{neg} CD64^{neg}; CD103⁺ ou CD11b⁺). As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

Materiais e Métodos

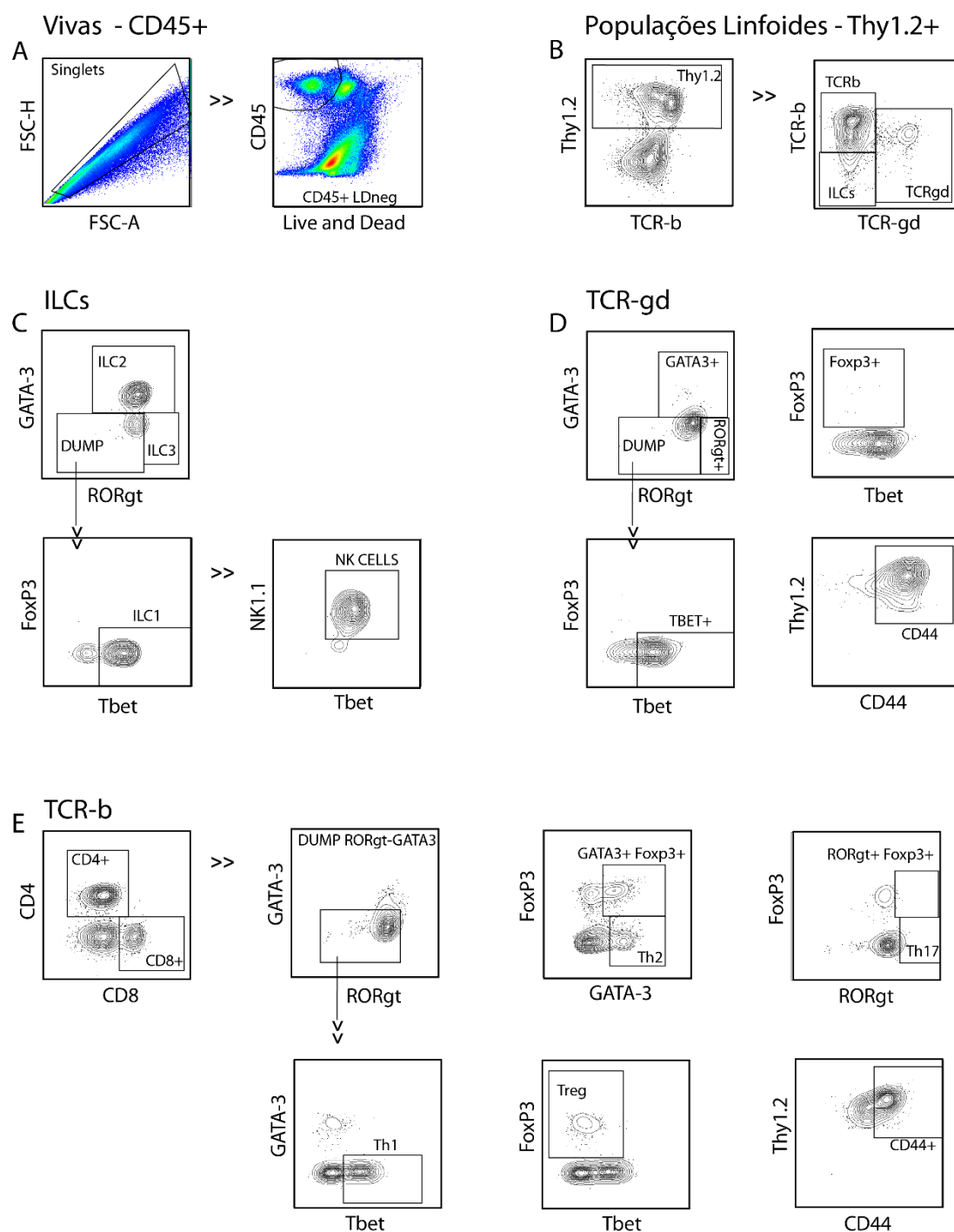


Figura 2 – Estratégias de gate para identificação das populações celulares de origem linfóide.

As análises foram feitas a partir da população de células vivas, CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1) (A e B). Foram caracterizadas ILCs (Thy1.2⁺ TCR-β^{neg} TCRγδ^{neg}), células TCR-β positivas (TCR-β⁺ TCRγδ^{neg} CD4⁺/CD8⁺) e TCRγδ positivas (TCRγδ⁺ TCR-β^{neg}). Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, RORγt e FoxP3. As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

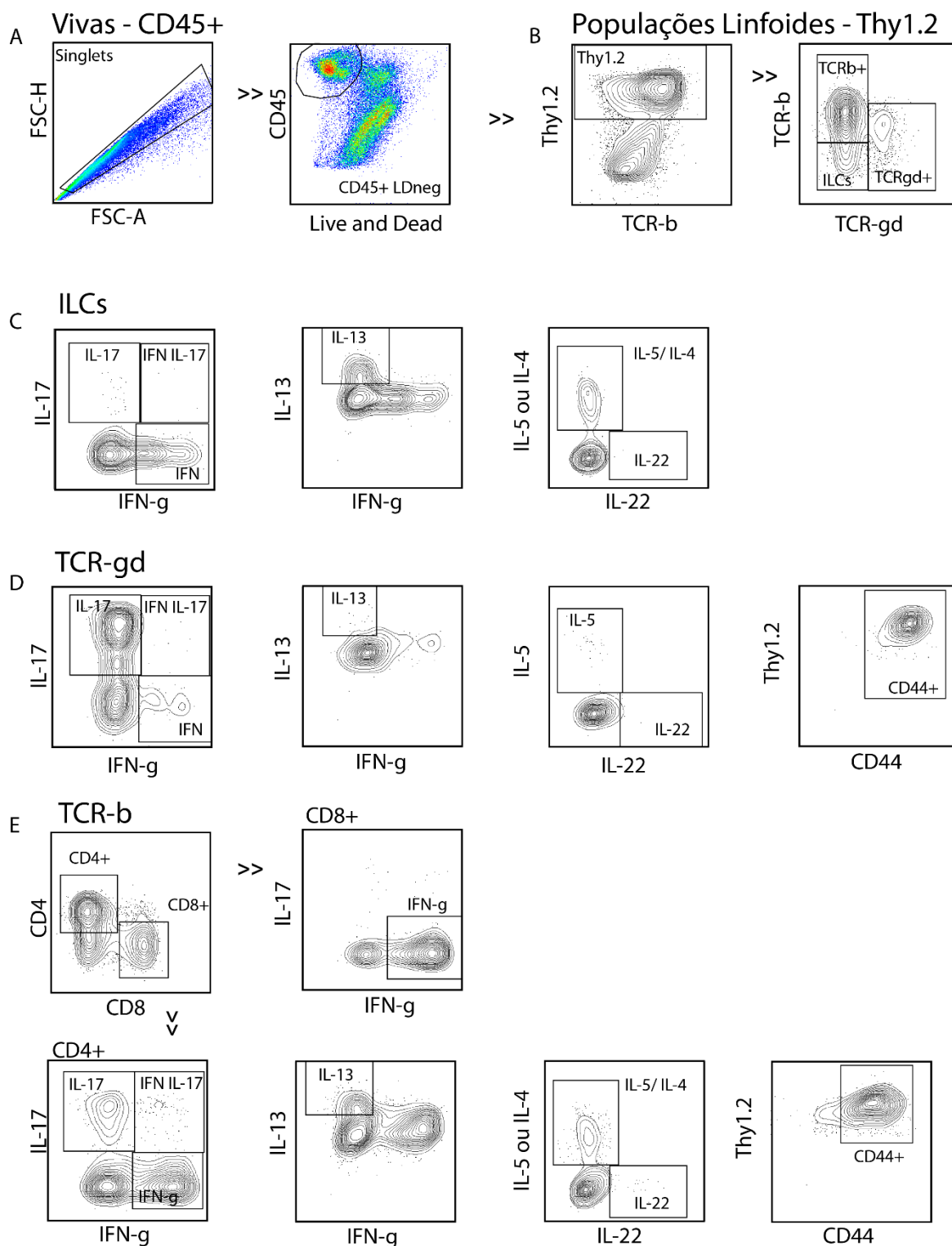


Figura 3 – Estratégias de gate para identificação do perfil de produção de citocinas.

As análises foram feitas a partir da população de células vivas, CD45⁺ e Thy1.2⁺ (CD90.1) (A e B). Foram caracterizadas ILCs (Thy1.2⁺ TCR-β^{neg} TCRγδ^{neg}), células TCR-β positivas (TCR-β⁺ TCRγδ^{neg} CD4⁺/CD8⁺) e TCRγδ positivas (TCRγδ⁺ TCR-β^{neg}). Dentro destas populações, foi analisada a produção das seguintes citocinas: IFN-γ, IL-17, IL-22, IL-13 e IL-5. As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

3.11 – tSNE – *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

Para todas as populações celulares, fizemos a caracterização por análise algorítmica de tSNE, que computa todos os parâmetros derivados da análise e os aproxima por ordem de interação ou por similaridades de marcadores. As estratégias utilizadas para análise podem ser observadas na Figura 4. Nas células de origem mieloide, a análise foi realizada dentro das células vivas, CD45 positivas. Para as análises de fatores de transcrição e citocinas intracelulares, esta análise algorítmica foi feita a partir de um *DownSample* de células provenientes da população de células vivas de origem linfóide (Live and Dead^{neg}; CD45+; Thy1.2+). As populações foram concatenadas para estabelecer as similaridades entre os marcadores e o algoritmo foi aplicado, preconizando-se um total de 2000 interações por evento. Após as interações, os grupos experimentais foram separados e as populações celulares delimitadas. As estratégias de *gate* utilizadas para a análise dos dados com o algoritmo foram as mesmas utilizadas para determinar as populações na análise estatística.

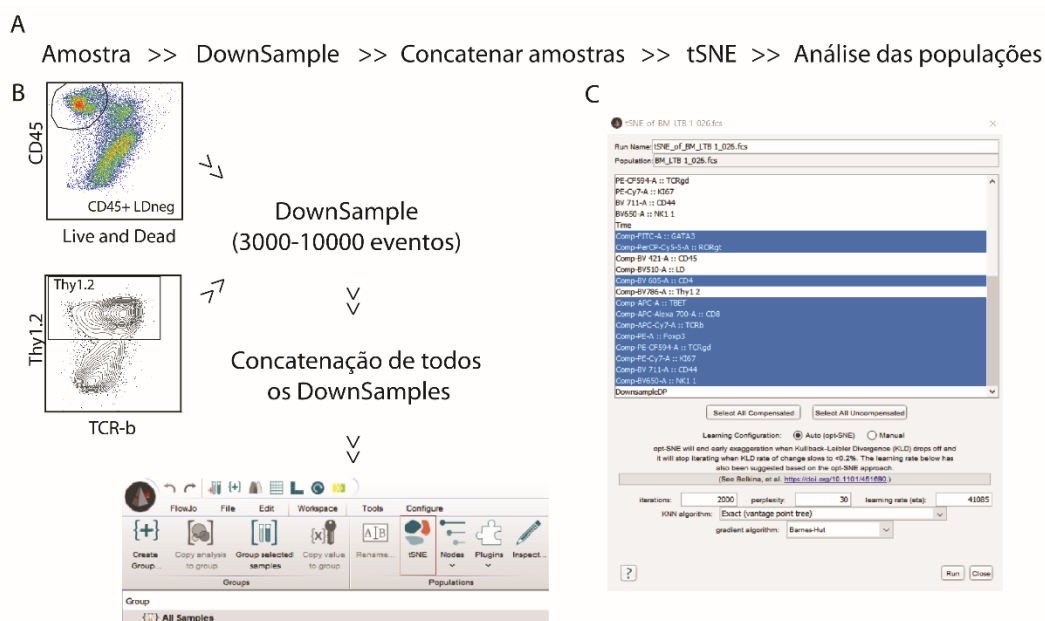


Figura 4 – *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* – tSNE.

A análise algorítmica de tSNE computa todos os parâmetros de marcação e os aproxima por ordem de interação ou por similaridades celulares. Nas células de origem mieloide, a análise foi realizada dentro das células vivas, CD45⁺. Para as análises de fatores de transcrição e citocinas intracelulares, esta análise algorítmica foi feita a partir de um *DownSample* de células provenientes da população de células vivas de origem linfóide (Live and Dead^{neg}; CD45⁺; Thy1.2⁺). As populações foram concatenadas e o algoritmo foi aplicado, preconizando-se um total de 2000 interações por evento e 30 de perplexidade. Após as interações, os grupos experimentais foram separados e as populações celulares delimitadas. As análises foram feitas com o auxílio do software FlowJo™.

3.12 – Histologia

A coloração de hematoxilina e eosina (HE) foi utilizada para avaliar a estrutura histológica dos tecidos coletados, que foram previamente fixados em Formaldeído 10% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). As peças foram enviadas à empresa Histocell^{LTDA} (São Paulo, Brasil) para processamento em parafina, seguido de coloração por HE, sendo preconizado uma espessura de 5 μ m para cada corte.

3.13 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 7.0. Inicialmente, foi aplicado um teste de análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey para comparar os dados entre os diferentes grupos experimentais. Para dados paramétricos, foi utilizado o teste T Student para grupos não pareados. Para dados não paramétricos, foi realizado o teste T Student, seguido do teste de Mann Whitney. Para análises de mais de dois grupos, foi utilizada a análise One-Way Anova. A análise de vários grupos, em tempos variados, foi realizada pelo teste Two-Way Anova. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$, sendo: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4. Resultados

4.1 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos VACht KD^{HOM}

Inicialmente, buscamos caracterizar o impacto da via colinérgica na homeostase das células imunológicas presentes no tecido adiposo. Para isso, utilizamos animais VACht KD, que possuem deficiência no transportador vesicular de ACh, possuindo apenas 35% de secreção ativa da vesícula nas sinapses neurais, conforme modelo descrito na seção Materiais e Métodos (PRADO et al., 2006). Analisamos o perfil dos leucócitos presentes no mesWAT, scWAT e baço destes animais, em comparação aos animais WT (Figura 5). O baço foi utilizado em comparativo aos tecidos adiposos, por ter atividade descrita em literatura nas vias de ação da via anti-inflamatória colinérgica (TRACEY, 2005).

Pudemos observar alterações significativas nas populações celulares no mesWAT, mas não no scWAT ou baço dos animais VACht KD quando comparados aos animais controle WT (Figura 5 A, C, E). Como pode ser visto na Figura 5 A, no mesWAT de camundongos VACht KD, houve um aumento significativo da frequência de eosinófilos, de macrófagos e neutrófilos, em comparação aos animais WT (Figura 5 G, J e M). Além disso, houve diminuição significativa na proporção e número absoluto de linfócitos B nos animais VACht KD em relação ao grupo controle. Essas alterações não foram observadas em tecidos como scWAT e baço (Figura 5 H, I, K, L, N, O). Embora tenhamos encontrado um aumento geral no infiltrado inflamatório no mesWAT dos animais VACht KD em relação ao grupo controle, chamou a nossa atenção o fato de ter havido uma redução expressiva no número total de células no mesWAT destes animais (Figura 5 B). Os animais VACht KD eram visualmente mais magros do que os animais WT e, por isso, normalizamos este número total pelo peso dos tecidos. A correção das células pela gramatura de tecido não mostrou nenhuma alteração significativa nos grupos estudados. A relação entre peso do tecido e número total de células pode ser vista no Material Suplementar 1.

Resultados

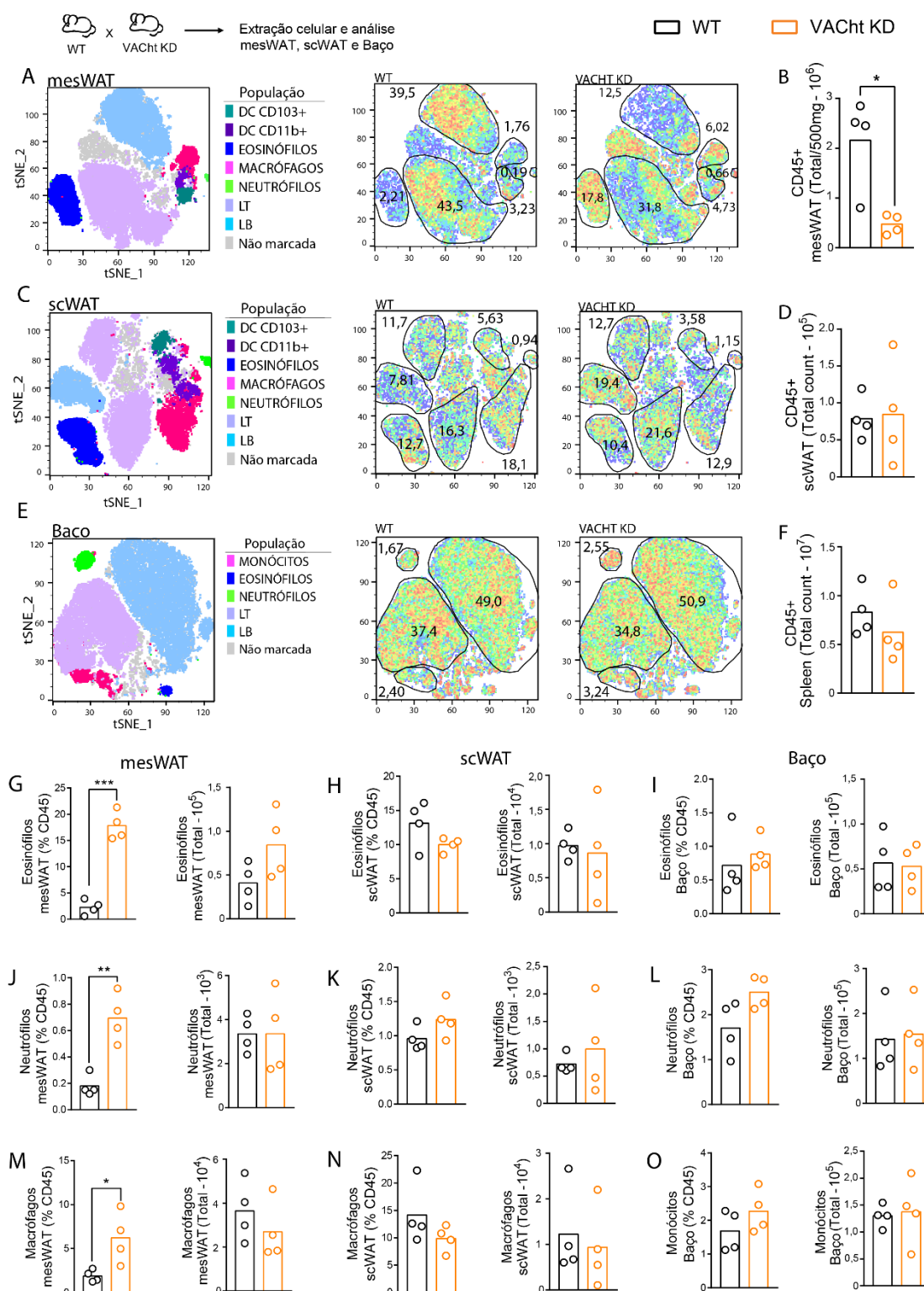


Figura 5 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, scWAT e baço de camundongos WT e VACht KD.

(A, C, E) tSNE dos leucócitos totais presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT), subcutâneo (scWAT) e baço de animais WT e VACht KD. (B, D, F) Contagem total de células nos tecidos analisados. (G - O) Números relativos e absolutos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos nos diferentes tecidos analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 1. Resultados representativos de um experimento reproduzido 2 vezes. Os gráficos de barra representam a média. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Avaliamos também o perfil das células T e ILCs presentes nos tecidos de animais VACht KD (Figuras 6 e 7). Foram analisadas as ILCs, células TCR- β (CD4⁺ e CD8⁺) e células TCR- $\gamma\delta$. De maneira semelhante ao que foi observado nas células mieloides e nos linfócitos B, percebemos que houve alteração significativa nas populações somente no mesWAT dos animais VACht KD, mas não no baço ou scWAT (Figura 6 A, B, C). Além disso, como houve uma redução expressiva do número total de células no mesWAT dos animais VACht KD, as alterações encontradas foram apenas com relação à frequência do tipo celular, mas não no número absoluto.

Com relação às células linfóides inatas, verificamos um aumento significativo na população de ILCs no mesentério dos animais VACht KD, quando comparados ao grupo WT (Figura 6). Essa alteração foi caracterizada por aumento significativo da frequência na população de ILCs do tipo 2 no mesentério de animais VACht KD em relação ao grupo controle. De maneira oposta, houve diminuição na porcentagem e número absoluto de células ILC3 no mesentério nos animais VACht em relação aos controles WT (Figura 6 D-I).

Em relação ao infiltrado de linfócitos T CD4⁺, houve um aumento significativo na frequência das células Th1 (TCR- β ⁺CD4⁺Tbet⁺), Th2 (TCR- β ⁺CD4⁺GATA-3⁺) e Th17 (TCR- β ⁺CD4⁺Roryt⁺) no mesentério do grupo VACht KD em relação ao WT (Figura 7 A-I). O mesmo aumento foi observado em relação aos linfócitos T TCR- $\gamma\delta$ ⁺, somente no mesWAT de animais VACht KD (Figura 7 P). Em contrapartida, houve diminuição na frequência e no número absoluto das células Treg (TCR- β ⁺CD4⁺Foxp3⁺) e nas células T CD8⁺ (TCR- β ⁺CD8⁺) no mesentério dos animais VACht KD em relação ao grupo controle WT (Figuras 7 J e 7 M). Portanto, estes resultados sugerem que a redução do tônus colinérgico nos animais VACht está associada a um aumento no percentual de eosinófilos, linfócitos T auxiliares efetores e ILC2 em detrimento de células Treg e linfócitos T citotóxicos.

Resultados

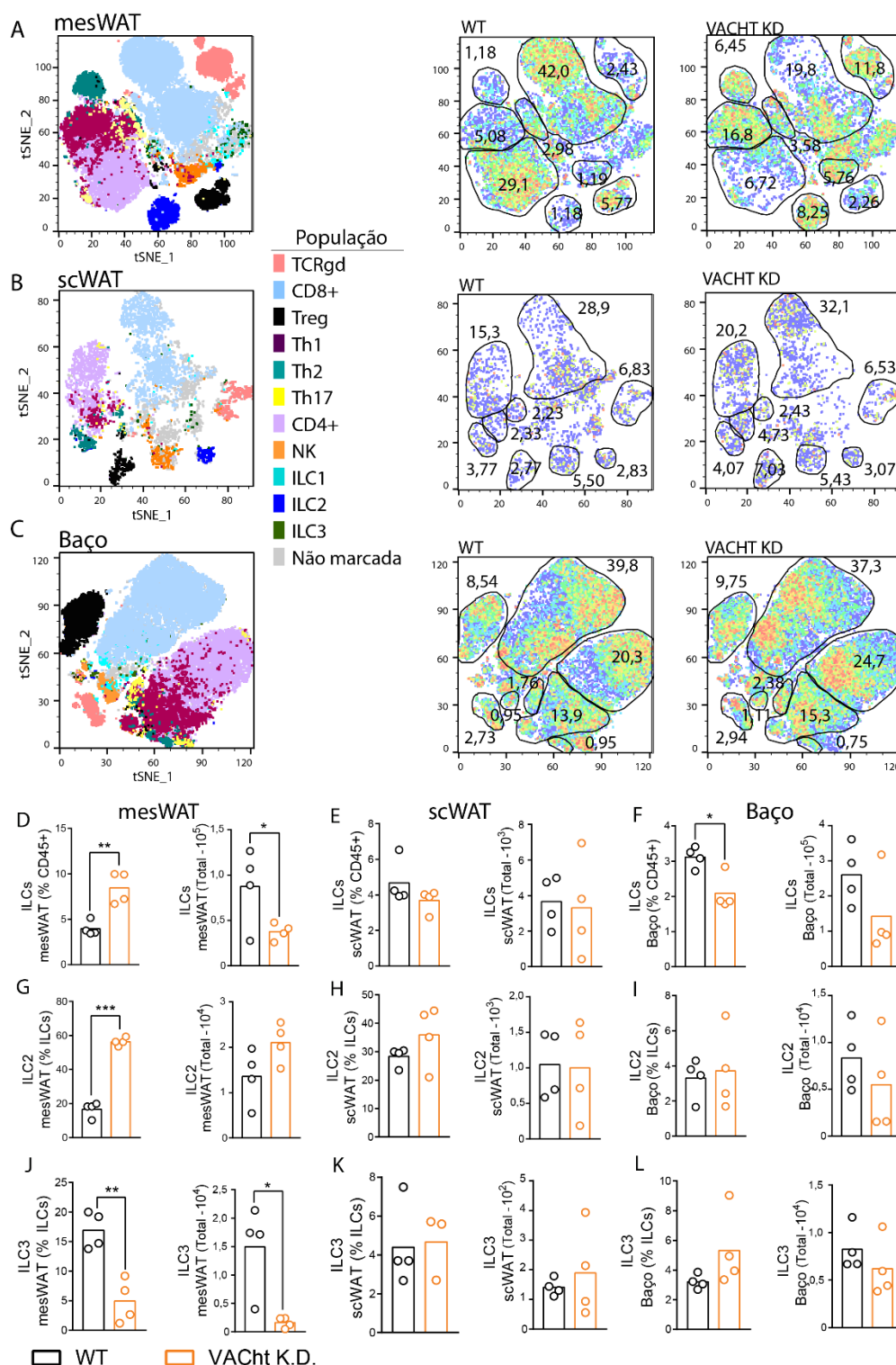


Figura 6 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfóide nos tecidos de animais WT e VACht KD.

(A, B, C) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT), subcutâneo (scWAT) e baço de animais WT e VACht KD. O algoritmo do tSNE foi efetuado em relação à expressão de fatores de transcrição pelas células. Foram analisadas as ILCs, células TCR- β (CD4+ e CD8+) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3. (D – L) Perfil das ILCs nos tecidos. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

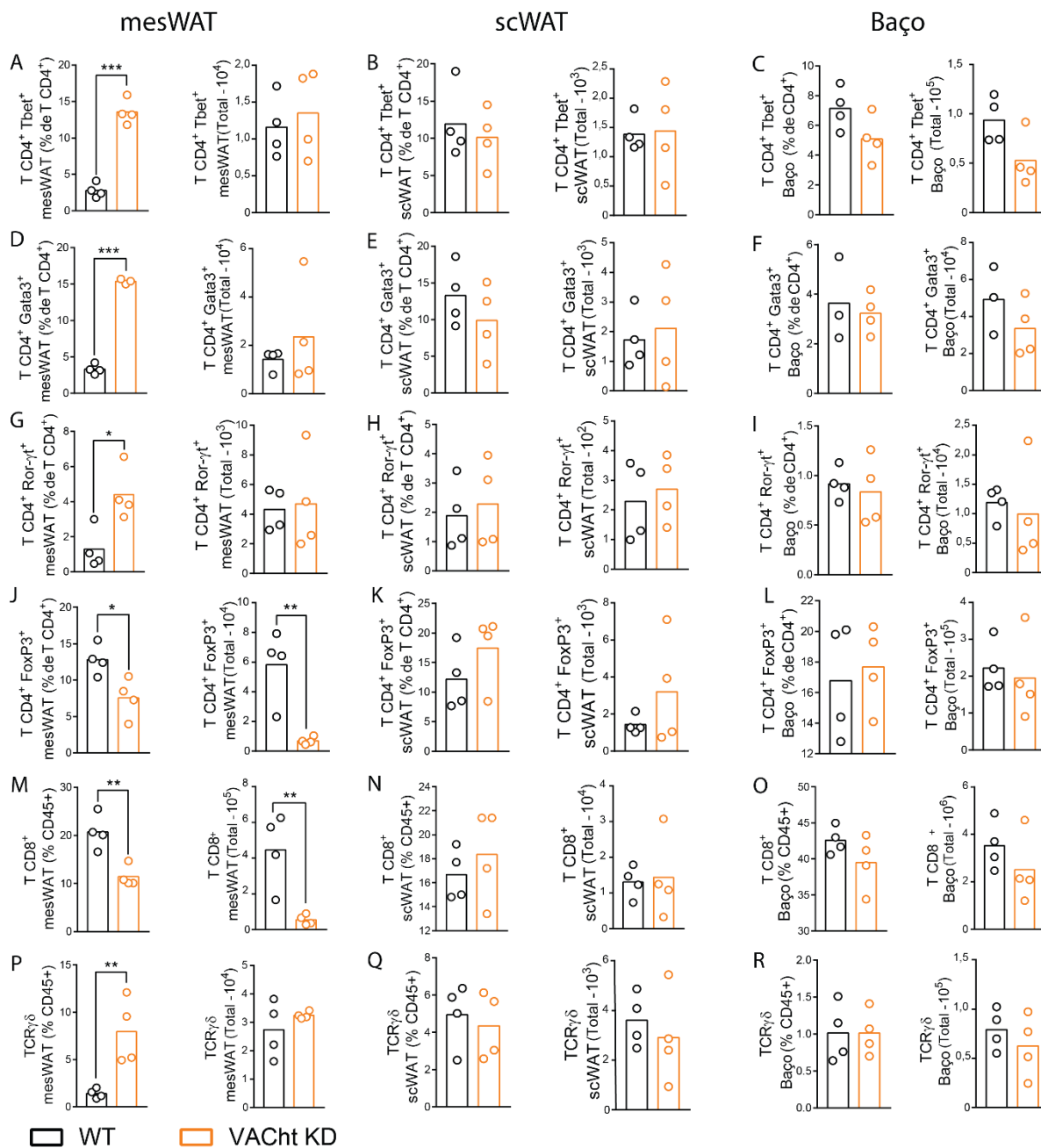


Figura 7 – Caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e células T TCR- $\gamma\delta$ em animais WT e VACht KD.

(A – R) Números relativos e absolutos de T CD8+, células TCR- $\gamma\delta$ e células T CD4+ em animais WT e VACht KD^{HOM}. A identificação das células foi feita a partir da marcação de fatores de transcrição. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Analizamos também o perfil de produção de citocinas, determinada por marcação intracelular nas células de origem linfoide. Com relação à produção de citocinas pelas ILCs, houve aumento nas populações produtoras de IL-5 e IL-13 no mesWAT de animais VACht KD quando comparados aos WT, corroborando com o aumento já demonstrado nas ILC do tipo 2 (Figura 8 A, D, G). Houve também aumento na frequência de células ILC produtoras de IL-17 no mesentério dos animais VACht KD em relação aos controles, apesar da redução prévia da presença das ILC3 no grupo VACht (Figura 8 J). Nas células T TCR- β +, percebemos aumento significativo na porcentagem de células produtoras de todas as citocinas analisadas na população T CD4⁺ do mesentério de animais VACht KD, IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-22 e IL-17 (Figura 9 A, D, G, J, M) em relação ao grupo controle. De forma semelhante às análises anteriores, observamos alterações significativas somente no mesWAT de animais VACht KD em relação aos WT, mas não no scWAT ou baço. Estes dados, juntamente com o aumento expressivo da frequência de eosinófilos no mesWAT, sugerem que a via colinérgica possa exercer um efeito supressor sobre a resposta imunológica no mesentério e, em particular, de maneira mais acentuada sobre o tônus de perfil Th2 neste tecido, estando este aumentado em todos os tipos celulares (células inatas mieloides, linfoides e adaptativas) com a ablação parcial desta via.

Além do perfil transcricional e de produção de citocinas pelas células linfoides, analisamos também a ativação celular pela expressão de CD44, e a proliferação celular, pela expressão do marcador Ki67 (Figura 10). A expressão destes marcadores foi observada no painel de marcação para fatores de transcrição. Quando analisamos a expressão de CD44, percebemos que todas as populações linfoides efetoras no mesWAT dos animais VACht KD apresentaram maior expressão desta molécula em relação às células efetoras de animais WT (Figura 10 A). Isso não foi observado no scWAT ou baço. Tal fenômeno também foi observado para o marcador de proliferação, Ki67 (Figura 10 B). Esses resultados demonstram que as células do tecido adiposo visceral de animais com restrição da via colinérgica parecem estar mais ativadas e com maior taxa de proliferação, em relação aos animais controle, apesar de se apresentarem em menor número.

Resultados

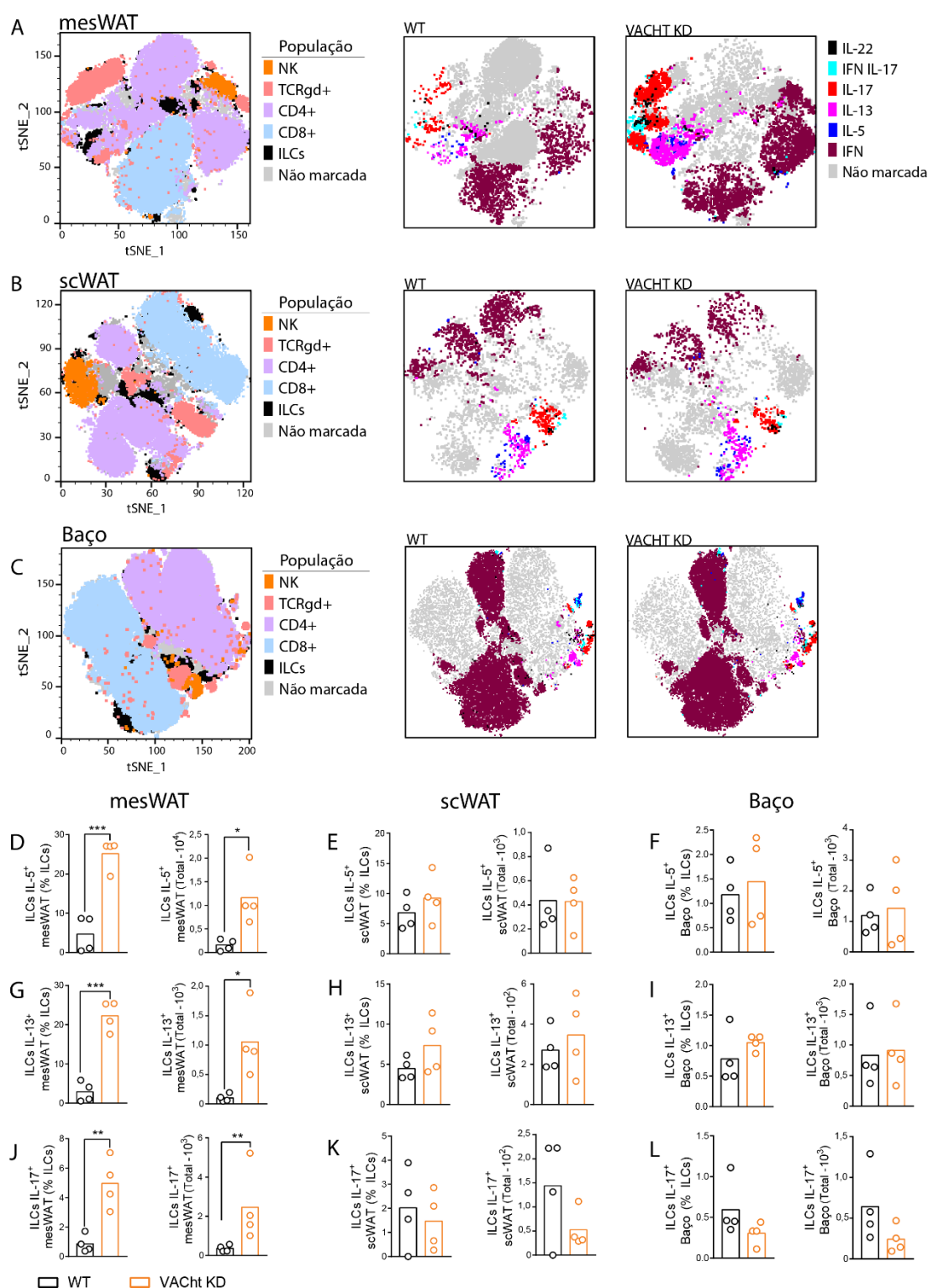


Figura 8 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais WT e VACht KD.

(A, B, C) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT), subcutâneo (scWAT) e baço de animais WT e VACht KD. A produção de citocinas foi avaliada nas ILCs, células TCR- β (CD4⁺ e CD8⁺) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, IL-22. (D-L) Produção de citocinas pelas ILCs do mesWAT, scWAT e baço dos animais WT e VACht K.D. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

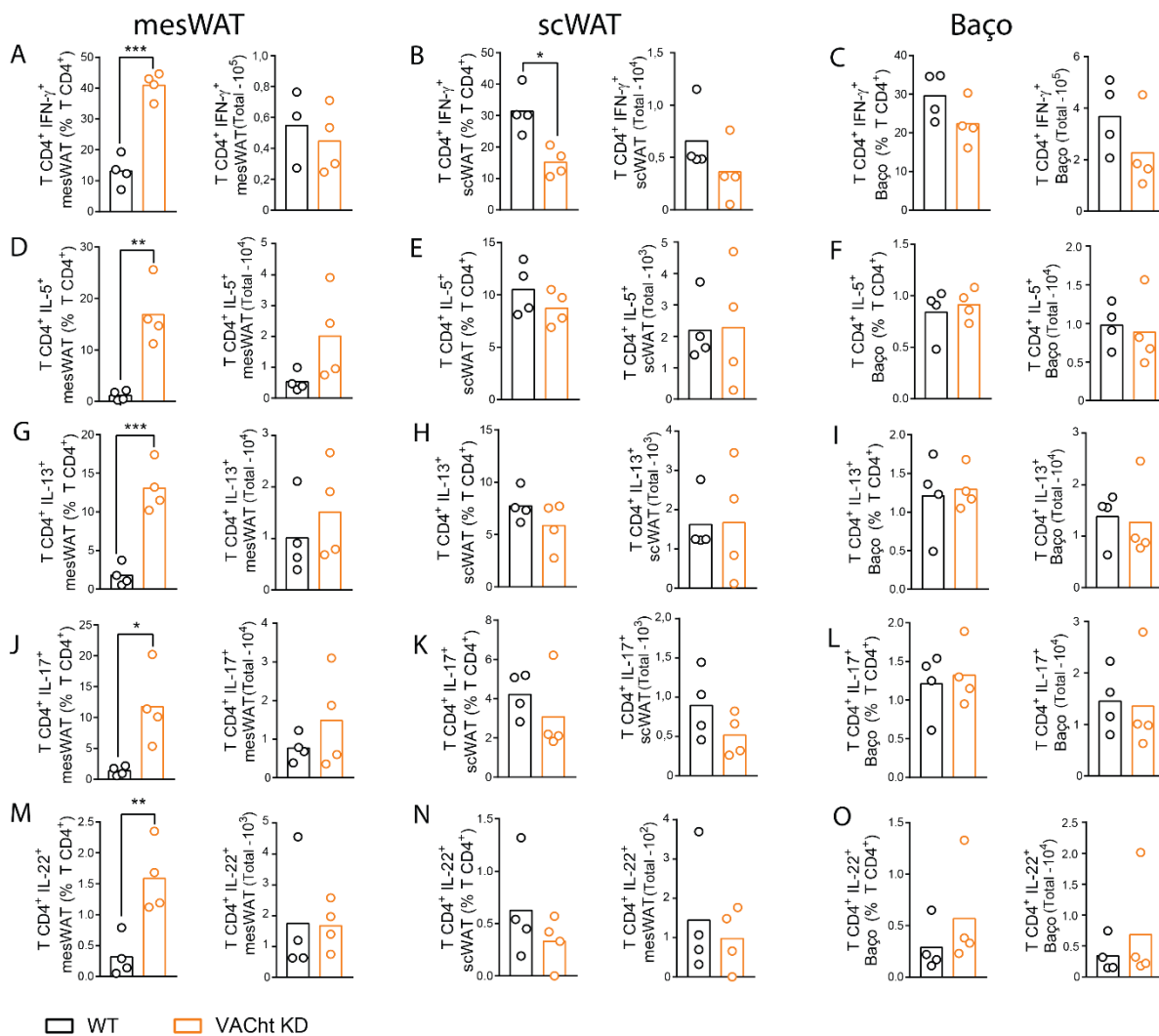


Figura 9 – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ em animais WT e VACht KD.

(A – O) Números relativos e absolutos de produção de citocinas pelas células T em animais WT e VACht KD. As células CD4⁺ foram analisadas quanto à produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17e IL-22. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

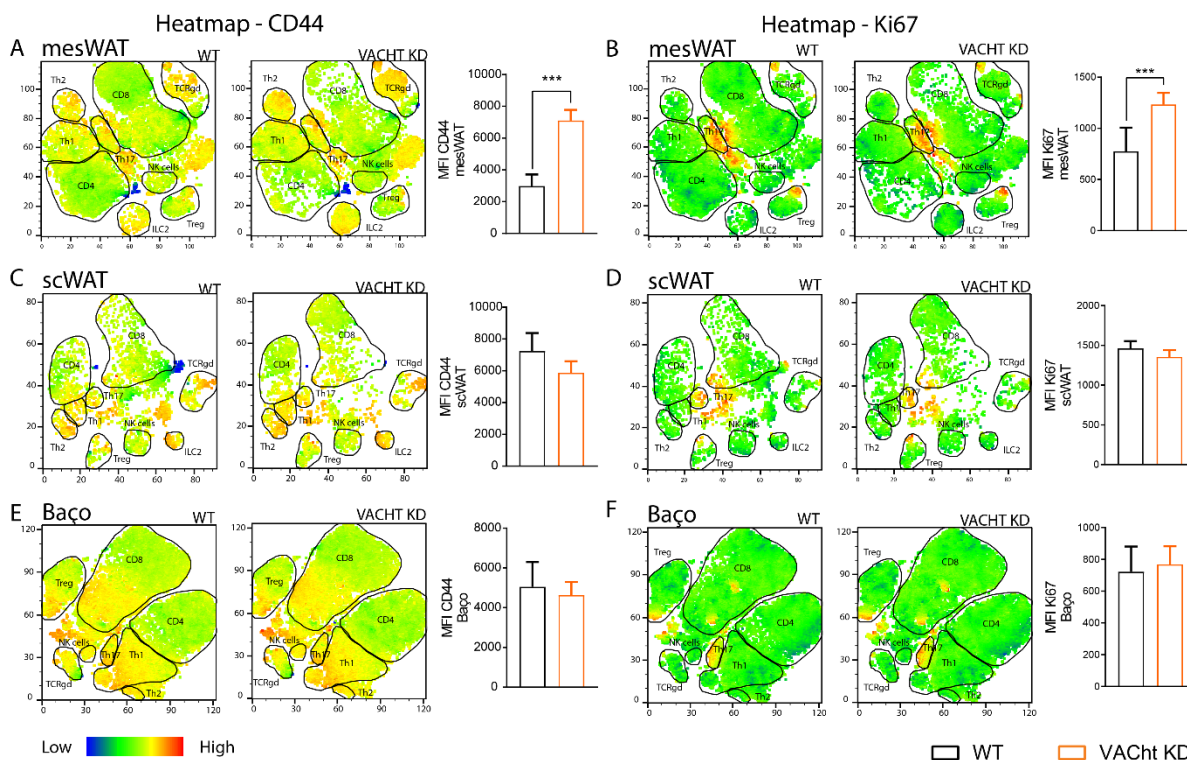


Figura 10 – Expressão de CD44 e Ki67 nas células linfoides do mesWAT, scWAT e baço de animais WT e VACht KD.

(A, C, E) A expressão de CD44 foi utilizada como um marcador de ativação celular, (B, D, F) e a expressão de Ki67 é indicativo de proliferação celular. As análises de expressão por Heatmap foram realizadas no painel de marcação para fatores de transcrição. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.2 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos após tratamento com mecamilamina

Considerando que o modelo de ablação da sinalização colinérgica pelo uso de animais *knockdown* é muito amplo, atuando em várias regiões do organismo do animal e, ainda, pode possuir outras interferências como microbiota e *background* genético dos animais, utilizamos um modelo farmacológico para bloqueio da via colinérgica em animais WT, que ocorreu de forma mais específica em receptores nicotínicos (nAChR). Para estes experimentos, foi utilizada a droga mecamilamina. A mecamilamina é um antagonista não seletivo e não competitivo dos nAChR. Os animais foram tratados pela via I.P., durante quatro semanas, em dias alternados.

Resultados

Após tratamento, os animais foram eutanasiados e os tecidos analisados de forma similar ao feito com os animais VACht KD; porém, neste experimento, buscamos analisar também a participação do linfonodo mesentérico (mLN), para verificar se a resposta observada nos animais VACht KD era tecido específica, ou passava também pelos órgãos linfoides secundários alocados neste tecido.

Avaliamos o perfil dos leucócitos no mesWAT, mLN e baço dos animais. Após tratamento farmacológico com a mecamilamina, houve aumento significativo da frequência de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos no mesWAT de animais tratados com a droga em comparação aos animais que receberam apenas a salina (Figura 11 A, G, J, M). Houve também diminuição na proporção e número absoluto de linfócitos B e no número total de células no mesWAT dos animais após tratamento com o inibidor colinérgico, em comparação aos animais tratados com o veículo (Figura 11 A e B). Essas alterações não foram encontradas no mLN e baço dos animais com inibição farmacológica da via. A caracterização de células mieloides no mesWAT de animais após tratamento com a mecamilamina mostrou perfil bastante similar ao observado nos animais VACht KD. (Figura 11 G – O). Além disso, na inibição farmacológica da via colinérgica, também observamos uma diminuição no número total de leucócitos presentes no mesentério destes animais (Figura 11 B).

Em relação às células de origem linfoide, houve um aumento considerável no número de ILCs no mesWAT de animais tratados com a mecamilamina em relação aos controles não tratados, evidenciado pelas ILCs do tipo 2 (Figura 12 A, D, G). Isso não foi observado nas ILCs presentes no mLN e no baço destes animais (Figura 12 B, C, E, F, H, I). Quanto às células T CD4⁺, houve aumento significativo nas células Th1 (TCR-β⁺ CD4⁺Tbet⁺) e, principalmente nas Th2 (TCR-β⁺ CD4⁺ GATA-3⁺) no mesWAT de animais tratados com a droga, em comparação aos animais que receberam somente a salina (Figura 13 D e G). De maneira oposta, houve diminuição nas células T CD8⁺ no mesWAT dos animais tratados com o inibidor colinérgico (Figura 13 J). Em relação às células TCR-γδ positivas, verificamos aumento significativo na população que expressa GATA-3⁺ no mesWAT dos animais tratados com a droga em relação aos controles. (Figura 13 G). Estas alterações não foram encontradas no mLN ou no baço.

Resultados

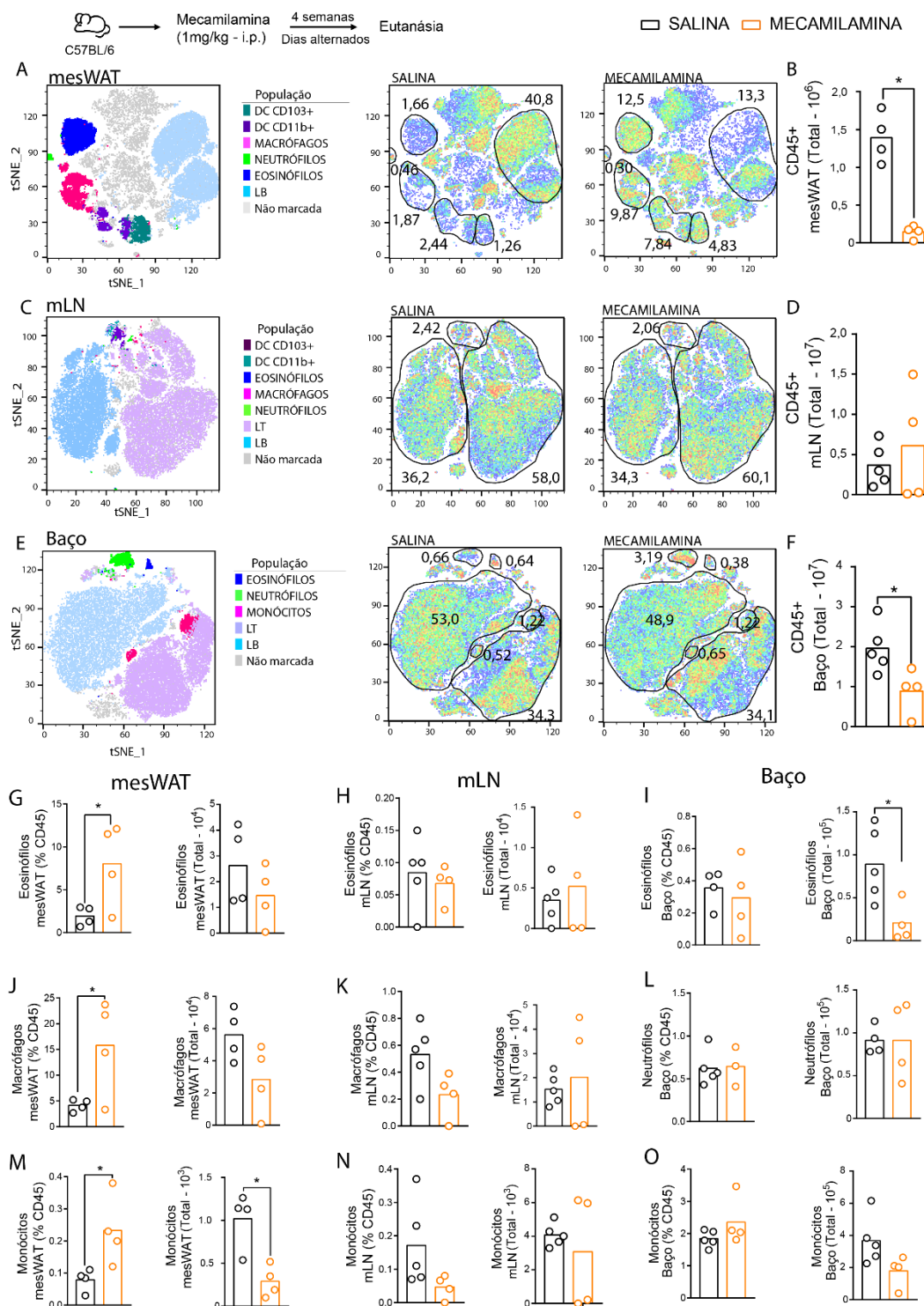


Figura 11 - Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, mLN e baço de camundongos tratados com salina e mecamilamina.

(A, C, E) tSNE dos leucócitos totais presentes no tecido adiposo mesentérico (mesWAT), linfonodos mesentéricos (mLN) e baço de animais WT e VACht K.D. (B, D, F) Contagem total de células nos tecidos analisados. (G - O) Números relativos e absolutos de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e monócitos nos diferentes tecidos. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 1. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. Os gráficos de barra representam a média. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

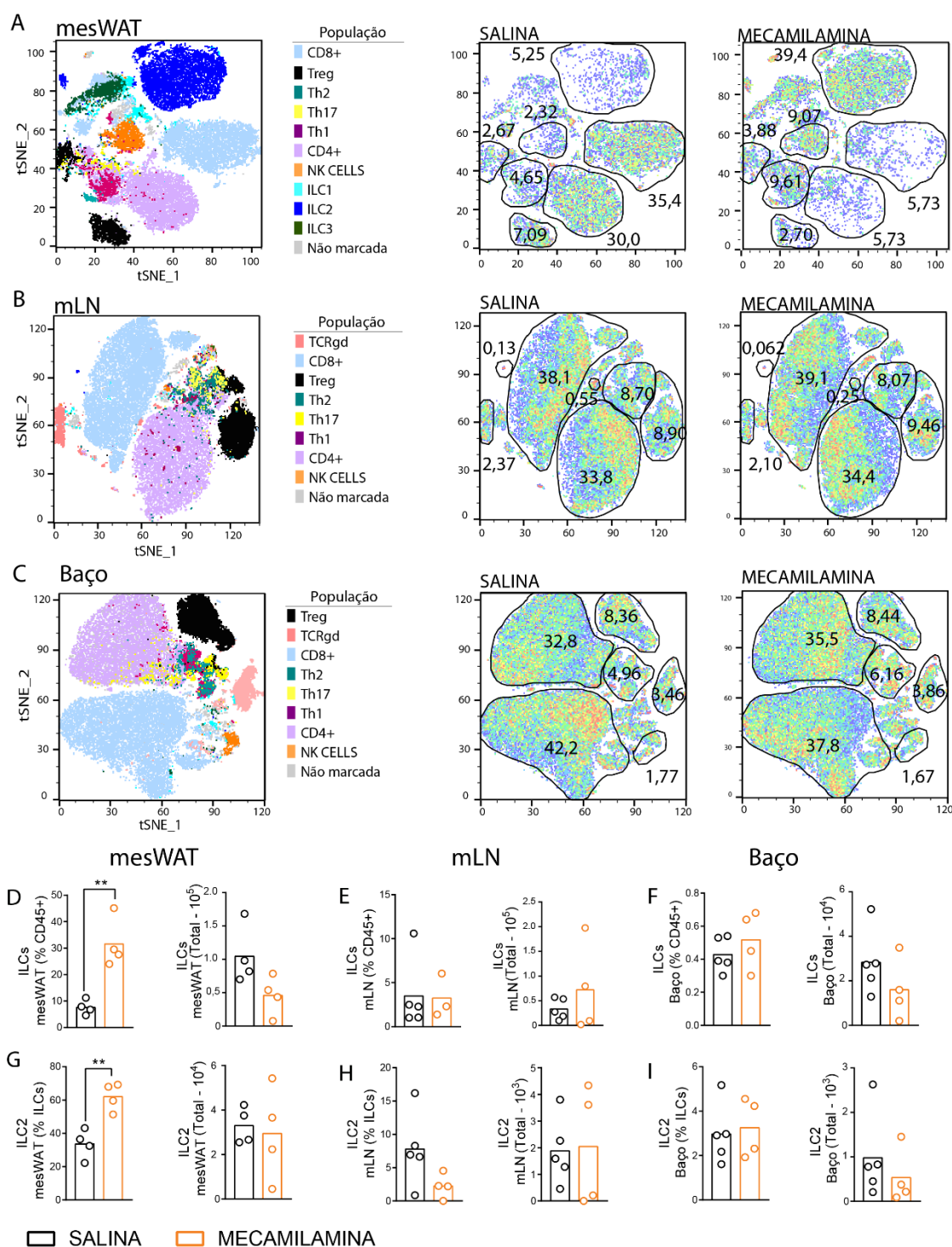


Figura 12 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfóide nos tecidos de camundongos tratados com salina e mecamilamina.

(A, B, C) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes no tecido adiposo mesentérico (mesWAT), linfonodos mesentéricos (mLN) e baço de animais WT e VACht K.D. O algoritmo do tSNE foi rodado em relação à expressão de fatores de transcrição pelas células. Foram analisadas as ILCs, células TCR- β (CD4+ e CD8+) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3. (D – I) Perfil das ILCs nos tecidos. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

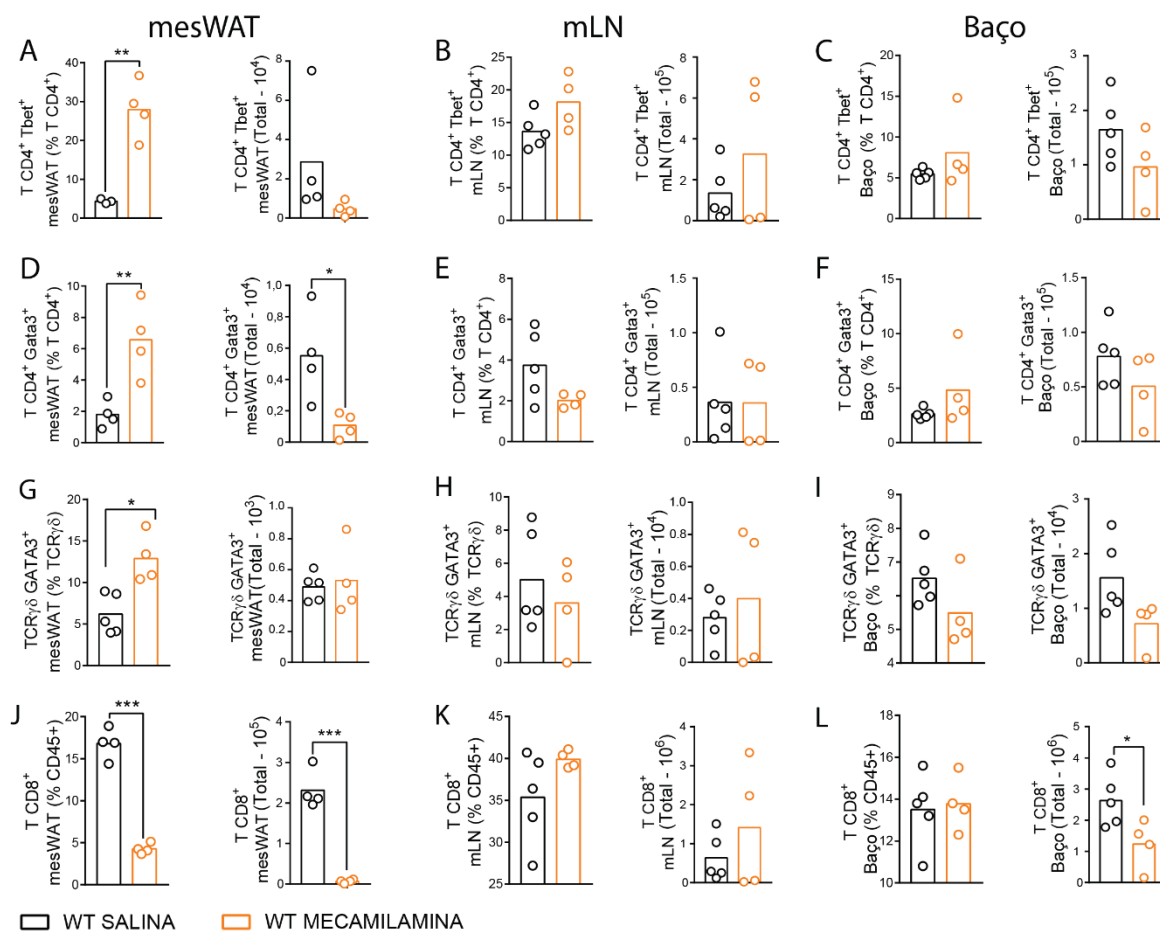


Figura 13 – Caracterização fenotípica das células T CD4⁺, células T TCR-γδ e células T CD8⁺ em animais tratados com salina ou mecamilamina.

(A – L) Números relativos e absolutos de células T CD4⁺, células TCR-γδ e células CD8⁺. A identificação das células foi feita a partir do painel de fator de transcrição. As ILCs foram identificadas de acordo com o fator de transcrição expresso: ILC1 (Tbet⁺ GATA-3^{neg} Rorγt^{neg}), ILC2 (Tbet^{neg} GATA-3⁺ Rorγt^{neg}), ILC3 (Tbet^{neg} GATA-3^{neg} RORγt⁺). Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Resultados

O perfil de produção de citocinas foi determinado nas células de origem linfóide. Em relação às ILCs, houve aumento significativo nas populações produtoras de IL-5 e IL-13 no mesWAT de animais tratados com a mecamilamina em relação aos animais tratados somente com salina (Figura 14 A, G, J). O perfil de aumento na produção destas citocinas, IL-5 e IL-13, foi também observado nas células T CD4⁺ no mesWAT dos mesmos animais. Além disso, houve aumento na população produtora de IFN- γ no mesWAT dos animais deste mesmo grupo (Figura 15 A, D, G). Novamente, não notamos alterações significativas no mLN ou no baço entre os diferentes grupos experimentais. Concluimos, assim, que o perfil das células linfóides no mesentério de animais tratados com a mecamilamina, tanto na expressão de fatores de transcrição quanto produção de citocinas, se assemelha ao observado nas células extraídas de animais VACht KD.

Analizamos também a expressão de CD44 e Ki67 nas células linfóides (Figura 16). Em relação à expressão de CD44, as populações efectoras do mesWAT de animais tratados com a mecamilamina foram as que mais expressaram a molécula CD44, em comparação às populações efectoras de animais tratados com a salina (Figura 16 A). Isso indica uma maior ativação destas células no mesWAT dos animais com inibição da via. Além disso, houve diferença na expressão de Ki67 entre os grupos tratados com salina ou mecamilamina (Figura 16 B). Animais tratados com mecamilamina apresentaram maior expressão do marcador de proliferação. Estas alterações não foram encontradas no mLN ou baço. Os dados nos mostram que as células residentes no mesWAT dos animais tratados com o inibidor colinérgico estão mais ativadas e se proliferando mais em relação aos animais controle. Como o tecido adiposo branco é um tecido com tônus imunológico padrão Th2, as células que se encontram mais acentuadamente aumentadas são aquelas associadas com este padrão de resposta. Isso corrobora com o que foi verificado nos animais transgênicos.

Para averiguar se outro órgão visceral poderia ser afetado pelo tratamento com a mecamilamina, avaliamos as populações celulares presentes no intestino delgado destes animais (Material Suplementar 2). Avaliamos as células mielóides e perfil transcricional e de produção de citocinas pelas células linfóides presentes no íleo. No entanto, nenhuma diferença evidente pôde ser observada em nenhuma população celular entre os dois grupos. Isso indica que as mudanças observadas podem ser restritas ao depósito de tecido adiposo visceral.

Resultados

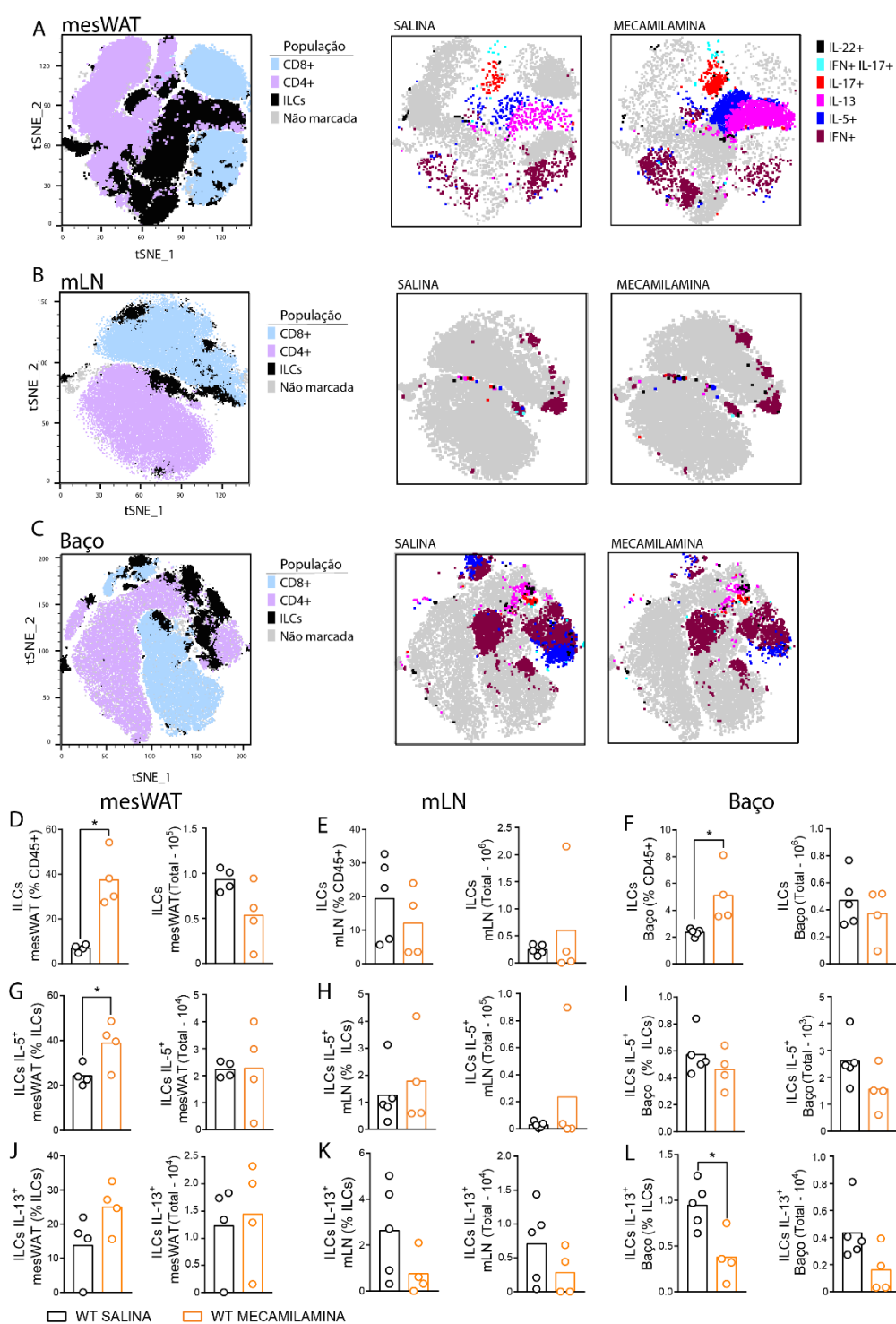


Figura 14 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais tratados com salina ou mecamilamina.

(A, B, C) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes no tecido adiposo mesentérico (mesWAT), linfonodos mesentéricos (mLN) e baço de animais WT e VACht K.D. A produção de citocinas foi avaliada nas ILCs, células TCR- β (CD4+ e CD8+) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, IL-22. (D-L) Produção de citocinas pelas ILCs do mesWAT, scWAT e baço dos animais WT e VACht K.D. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

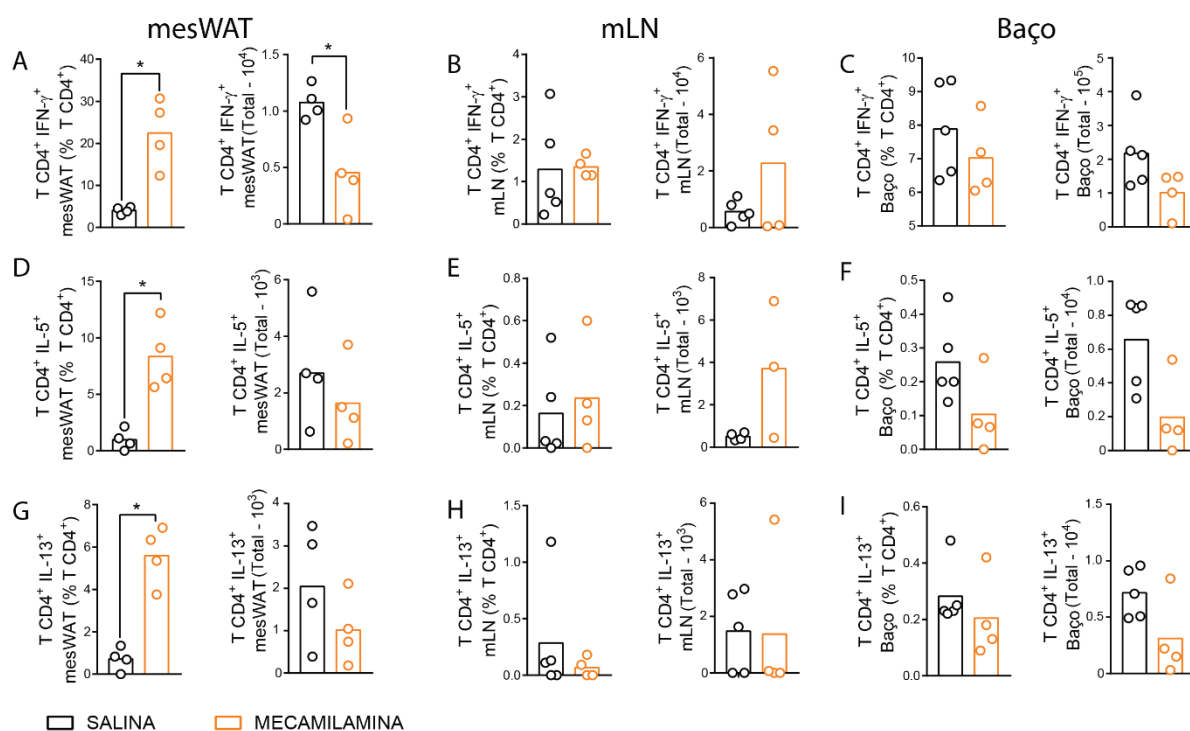


Figura 15 - Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ em animais tratados com salina ou mecamilamina.

(A - I) Números relativos e absolutos de produção de citocinas pelas células T. As células CD4⁺ foram analisadas quanto à produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17e IL-22. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Resultados

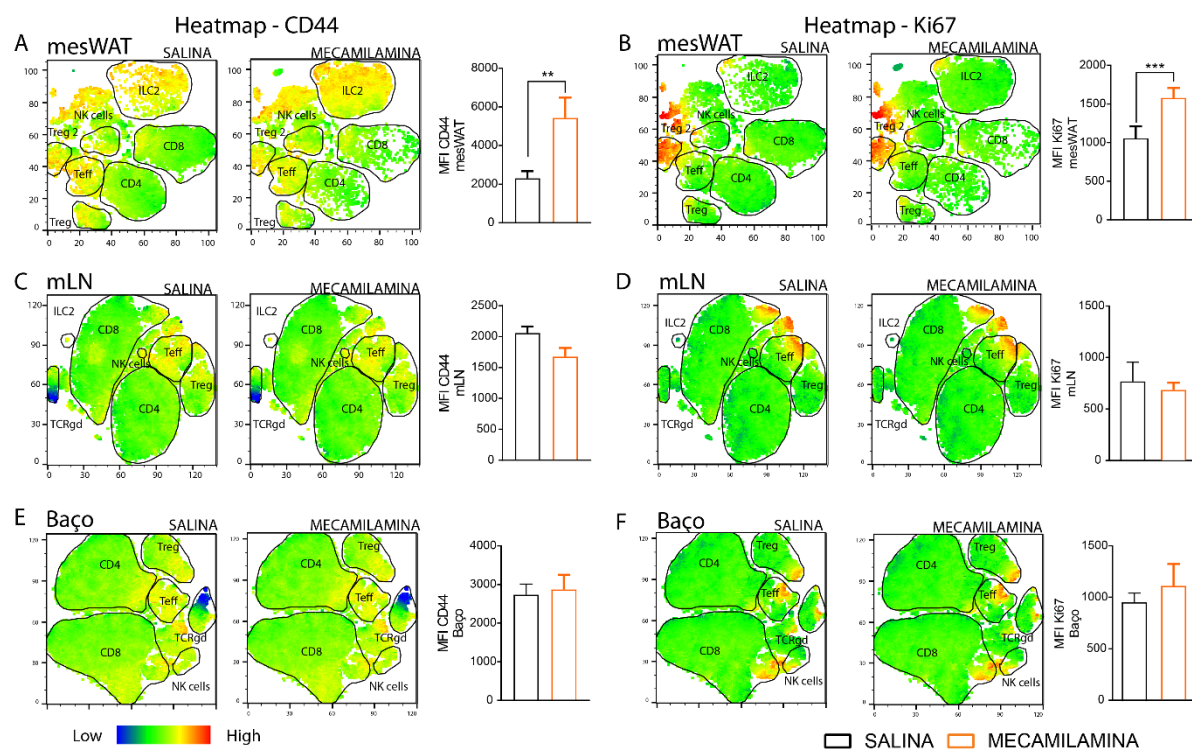


Figura 16 – Expressão de CD44 e Ki67 nas células do mesWAT, mLN e baço de animais tratados com a mecamilamina.

(A, C, E) A expressão de CD44 foi utilizada como um marcador de ativação celular, (B, D, F) e a expressão de Ki67 é indicativo de proliferação celular. As análises de expressão por Heatmap foram realizadas no painel de marcação para fatores de transcrição. Resultados representativos de um experimento reproduzido duas vezes.

4.3 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos submetidos à vagotomia unilateral

No próximo passo, analisamos se a ablação do principal nervo sinalizador via acetilcolina, o vago, poderia interferir na celularidade do tecido adiposo, com o intuito de avaliar também a contribuição de outras fontes de ACh (como leucócitos) para o fenótipo estudado. Para isso, caracterizamos o infiltrado inflamatório no tecido adiposo de animais submetidos à vagotomia unilateral direita. Avaliamos as populações celulares no mesWAT e scWAT destes animais (Figura 17). Observamos que houve uma tendência à diminuição da população de leucócitos CD45+ nos animais vagotomizados, tanto no tecido adiposo mesentérico, quanto no subcutâneo (Figura 17 B, D). Além disso, no mesWAT destes animais, houve tendência ao aumento na proporção de eosinófilos e macrófagos teciduais, mas não observamos diferença expressiva na proporção ou número de neutrófilos em relação aos animais Sham (Figura 17 A, E, F, G). Nas populações linfoides, houve diminuição de células B no

Resultados

mesentérico dos animais VgX (Figura 17 A). Quanto ao tecido adiposo subcutâneo, observamos aumento significativo na porcentagem de eosinófilos (Figura 17 B, H) e tendência à aumento na população de macrófagos, menos evidente que nos mesWAT dos mesmos animais (Figura 17 B, J).

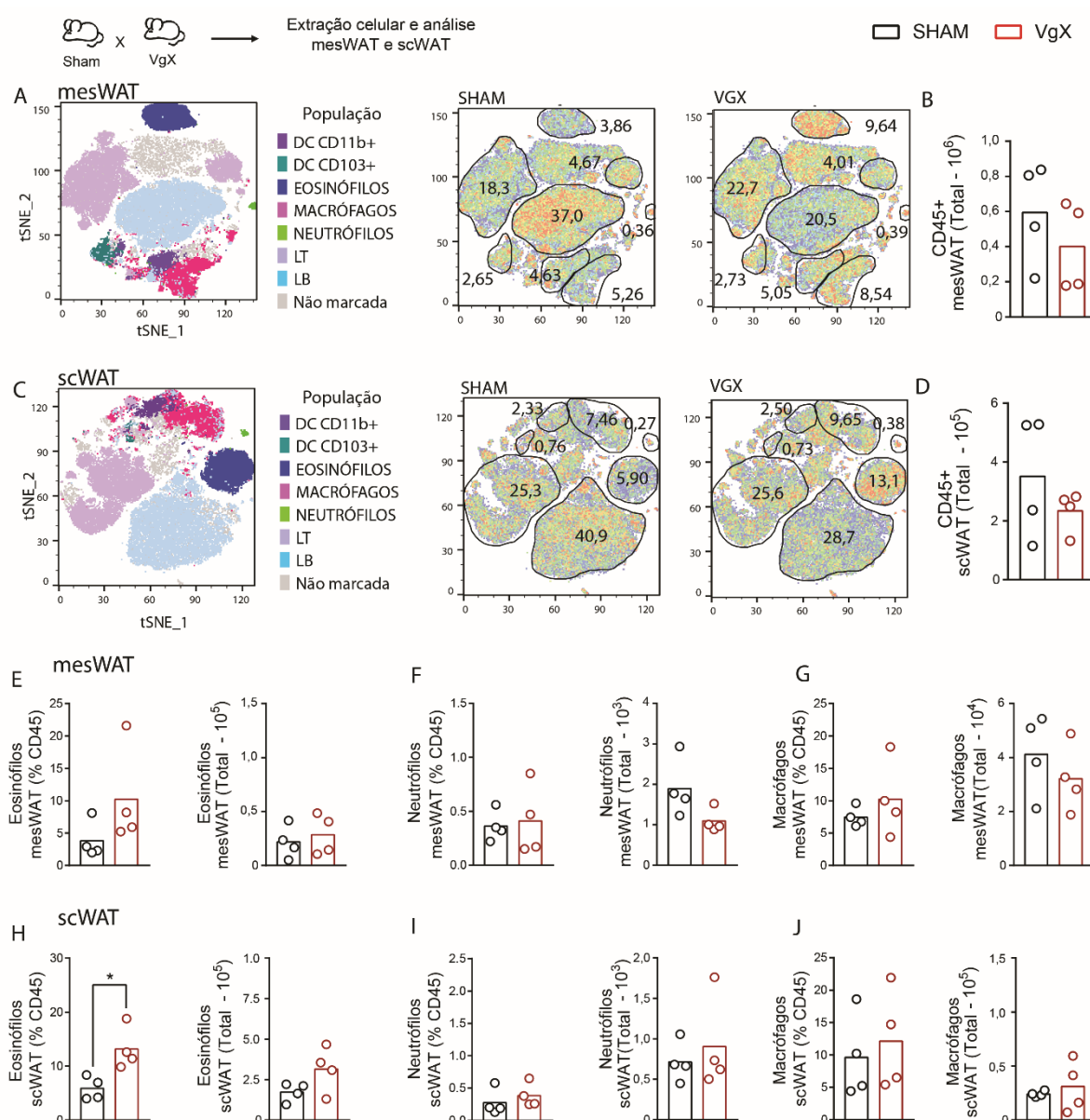


Figura 17 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos após vagotomia unilateral.

(A, C) tSNE dos leucócitos totais presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT) e subcutâneo (scWAT) de animais VgX e Sham. (B, D) Contagem total de células nos tecidos analisados. (E-J) Números relativos e absolutos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos nos diferentes tecidos analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 1. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos de barra representam a média. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Após análise das populações mieloides, avaliamos o perfil das populações de origem linfóide presentes nos tecidos adiposos (Figuras 18 e 18). Foram analisadas as ILCs, células TCR- β (CD4⁺ e CD8⁺) e células TCR- $\gamma\delta$. Percebemos que houve alteração significativa na proporção das populações celulares tanto no mesWAT quanto scWAT dos animais VgX. As alterações encontradas foram vistas também no número absoluto de células destes tecidos. Com relação às ILCs nos tecidos, vimos uma tendência ao aumento na população de ILCs do tipo 2 e 3 no mesWAT dos animais VgX, quando comparados ao grupo Sham (Figura 18 C, D). O mesmo pode ser observado para as ILCs do tipo 2 no scWAT dos animais VgX (Figura 18 E). Não houve alteração expressiva nas ILCs do tipo 1. Quanto aos linfócitos T CD4⁺, houve um aumento significativo na frequência das células Th2 (TCR- β +CD4⁺GATA-3⁺) no mesentério do grupo VgX em relação ao grupo Sham (Figura 19 A, G). Em contrapartida, houve tendência à diminuição na frequência e no número absoluto das células Treg (TCR- β +CD4⁺Foxp3⁺) destes mesmos animais (Figura 19 A, M). No scWAT, vimos aumento nas populações de células Th2 (TCR- β +CD4⁺GATA-3⁺) e células Th17 (TCR- β +CD4⁺Roryt⁺). Não houve alteração nas populações de células CD8⁺ em ambos os tecidos. Portanto, estes resultados sugerem que a redução do tônus colinérgico nestes animais está associada a um aumento de linfócitos T auxiliares efetores, principalmente os de perfil Th2 de resposta (GATA-3⁺).

Analizamos também o perfil de produção de citocinas nas células de origem linfóide. Houve aumento na produção de IL-13 pelas ILCs no mesWAT de animais vagotomizados quando comparados aos Sham, além de tendência a aumento de produção das citocinas IL-5 e IL-4, o que corrobora com o aumento demonstrado anteriormente nas ILC do tipo 2 (Figura 20 A, C, D, E). No scWAT, vimos aumento nas ILCs produtoras de IL-5 e IL-4, além de tendência ao aumento na população produtora da citocina IL-13 no grupo VgX, em relação ao controle Sham (Figura 20 B, F, G, H). Nas células TCR- β positivas, percebemos aumento significativo na porcentagem de células produtoras de IL-13 na população T CD4⁺ do mesentério de animais VgX em relação ao grupo controle, e aumento no número de células T CD4⁺ produtoras da citocina IL-5 (Figura 21 C, E). De forma semelhante, houve aumento destas mesmas populações no scWAT destes animais, além do aumento significativo da produção da citocina IL-4 pelas células T dos animais vagotomizados, em comparação ao controle (Figura 21 D, F, H). De forma geral, percebemos que os três

Resultados

modelos utilizados para bloqueio da via colinérgica foram capazes de modular a resposta do tipo 2 no mesWAT, e aumentar a produção das citocinas deste padrão.

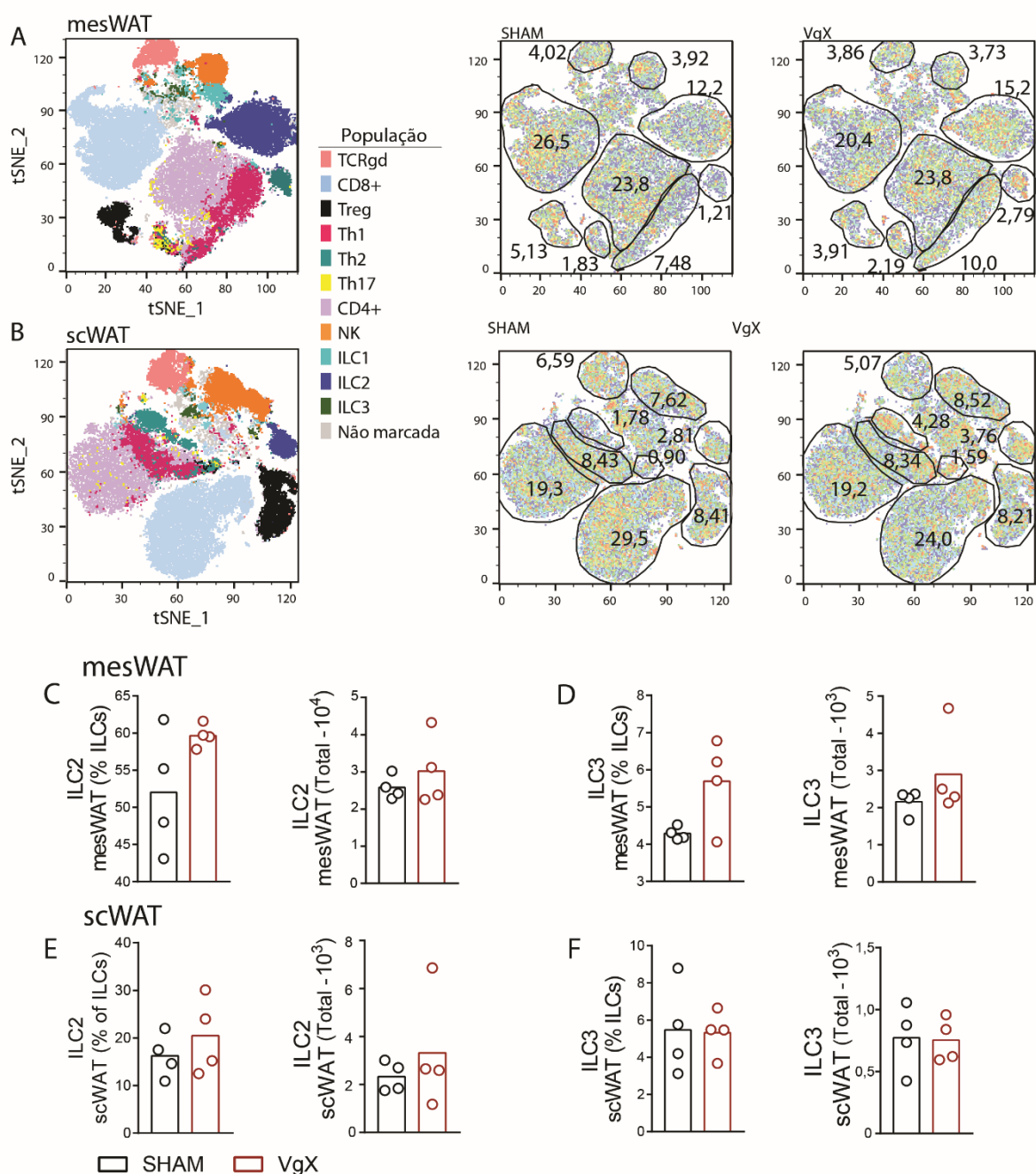


Figura 18 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfóide nos tecidos de animais vagotomizados.

(A, B) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT) e subcutâneo (scWAT) de animais VgX e Sham. O algoritmo do tSNE foi rodado em relação à expressão de fatores de transcrição pelas células. Foram analisadas as ILCs, células TCR- β (CD4+ e CD8+) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, foi analisada a expressão dos seguintes fatores de transcrição celular: Tbet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3. (D – N) Perfil das células CD4+ nos tecidos. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

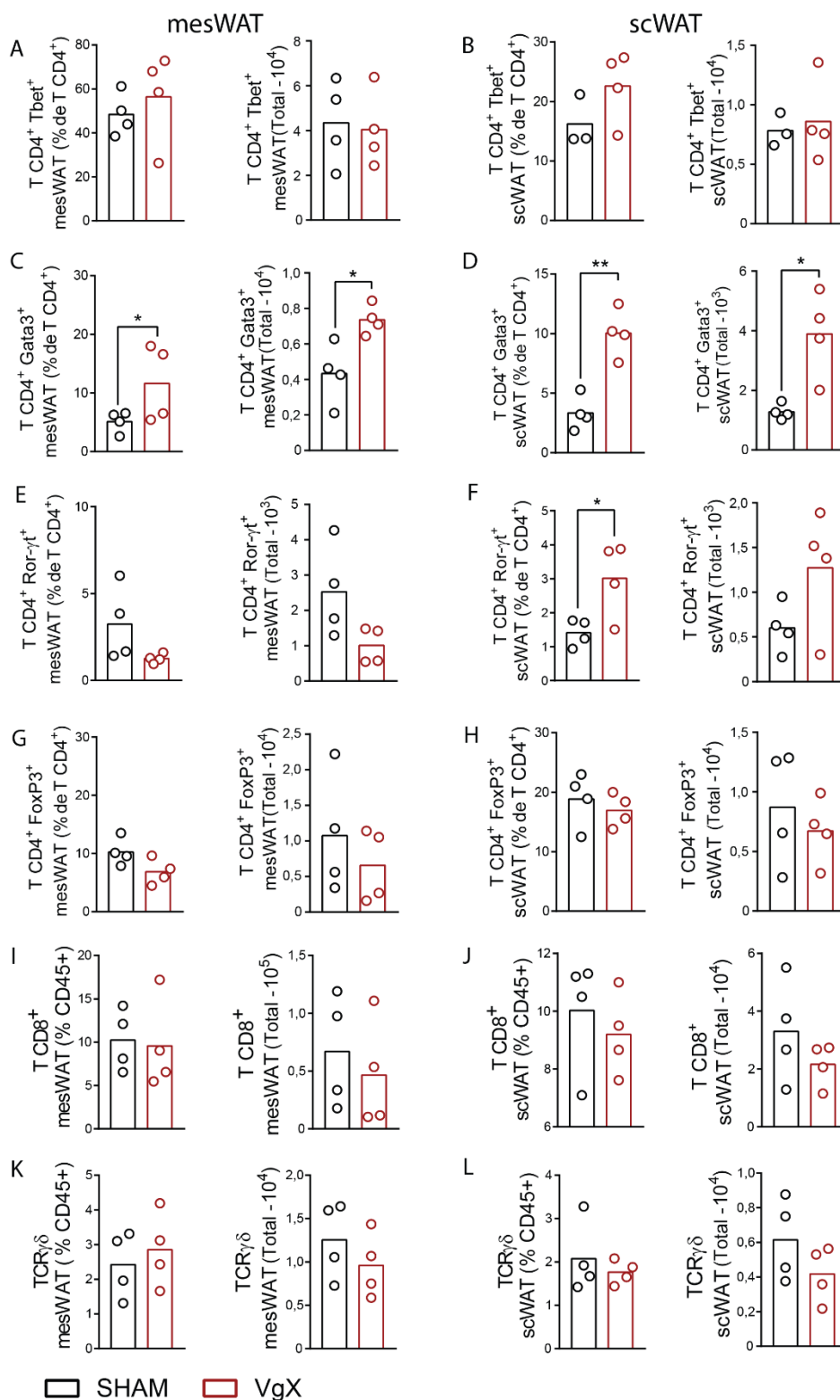


Figura 19 – Caracterização fenotípica das células T CD4⁺, T CD8⁺ e células TCR- $\gamma\delta$ e em animais vagotomizados.

(A – O) Números relativos e absolutos de ILCs, células TCR- $\gamma\delta$ e células CD8⁺. A identificação das células foi feita a partir do painel de fator de transcrição. As ILCs foram identificadas de acordo com o fator de transcrição expresso: ILC1 (Tbet⁺ GATA-3^{neg} Ror γ t^{neg}), ILC2 (Tbet^{neg} GATA-3⁺ Ror γ t^{neg}), ILC3 (Tbet^{neg} GATA-3^{neg} ROR γ t⁺). Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 2. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Resultados

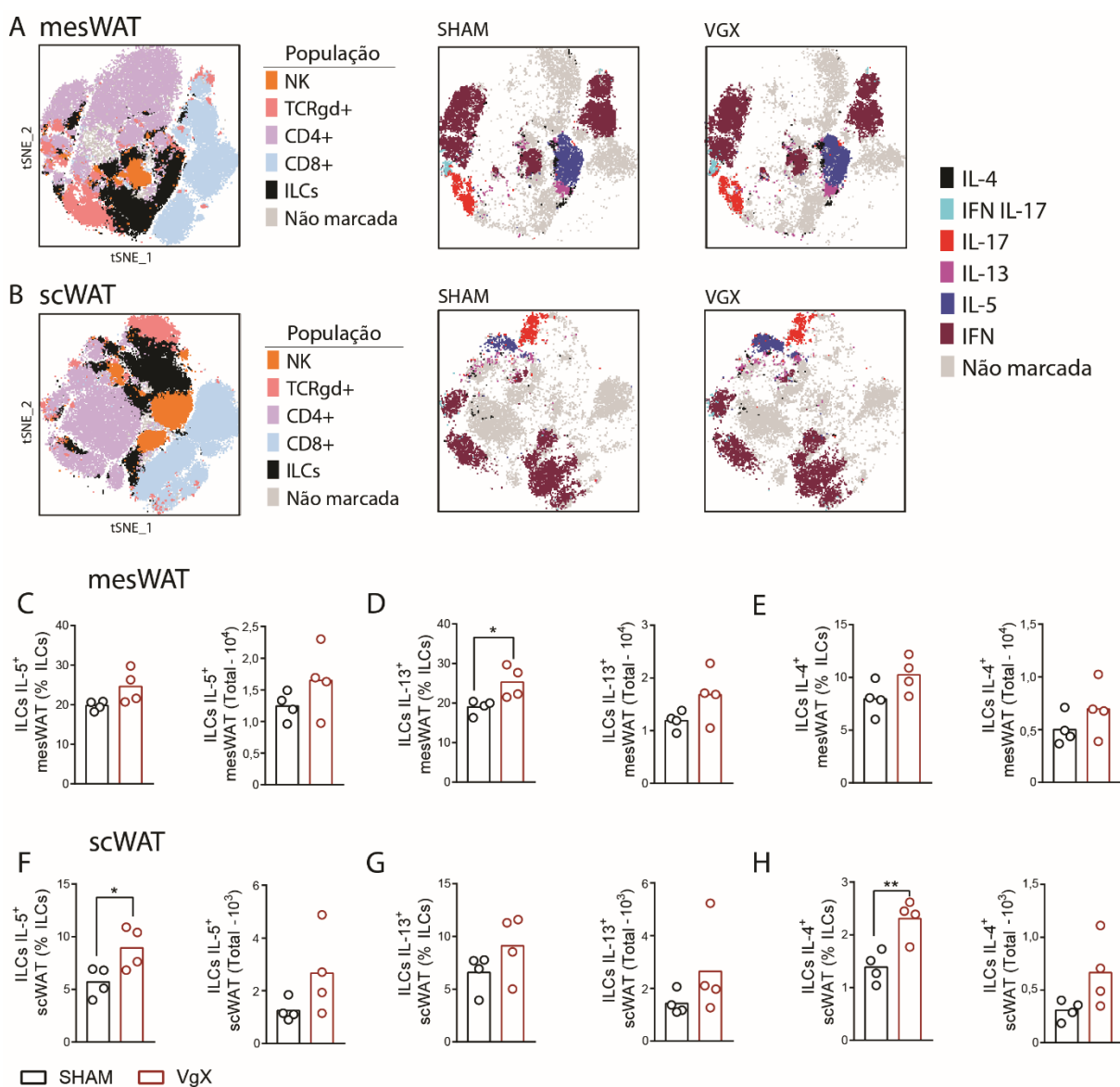


Figura 20 - Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais vagotomizados.

(A, B) tSNE das células Thy1.2 (CD90.1) presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT) e subcutâneo (scWAT) de animais VgX e Sham. A produção de citocinas foi avaliada nas ILCs, células TCR- β (CD4+ e CD8+) e células TCR- $\gamma\delta$. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, IL-22. (C-H) Produção de citocinas pelas ILCs do mesWAT e scWAT dos animais Sham e VgX. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

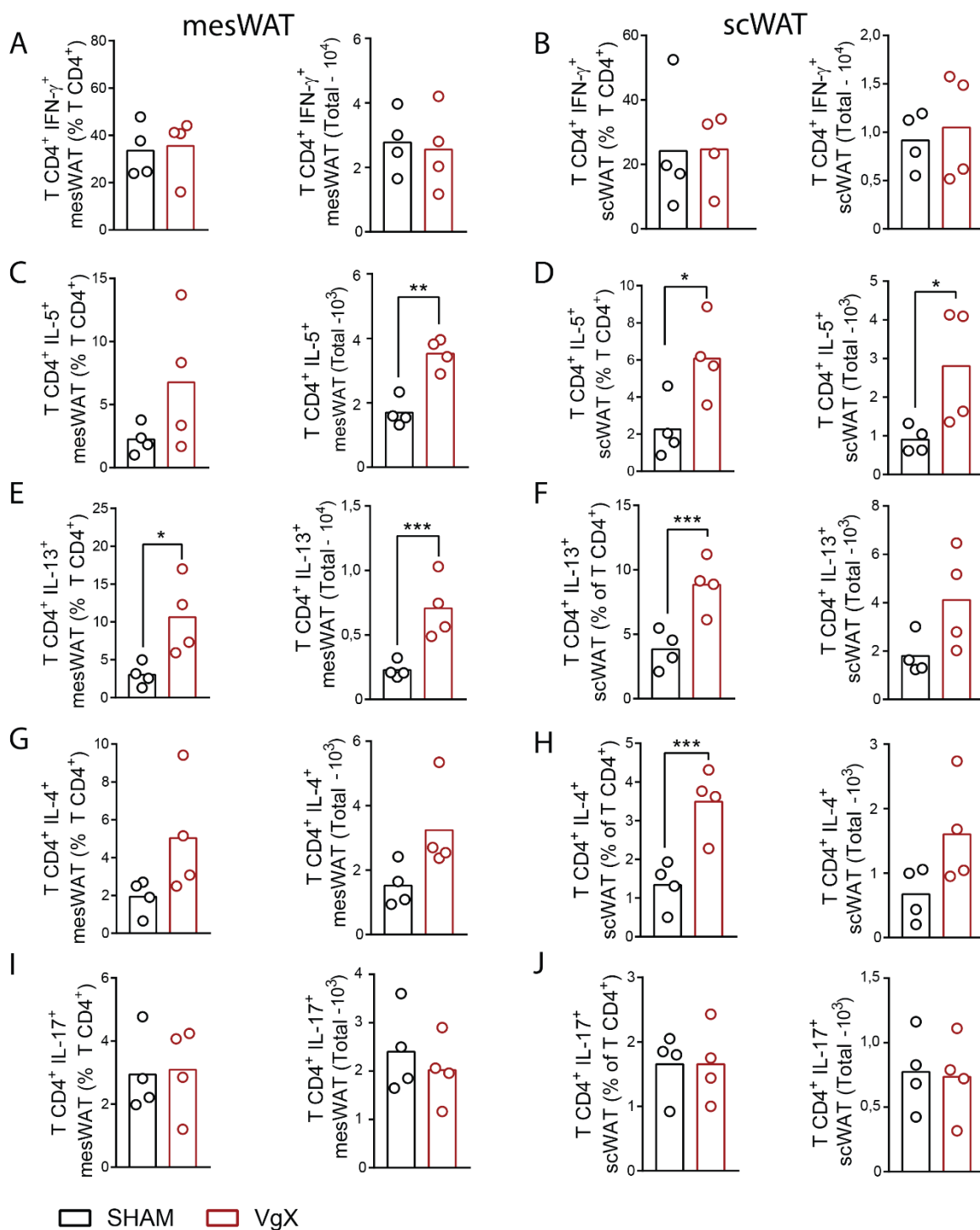


Figura 21 – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ em animais vagotomizados.

(A – J) Números relativos e absolutos de produção de citocinas pelas células T. As células CD4⁺ foram analisadas quanto à produção de IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17e IL-22. Os diferentes tecidos foram analisados de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

4.4 – Perfil metabólico de animais VACht KD^{HOM} submetidos à dieta hiperlipídica

Levando em conta as mudanças celulares que se desenvolvem com o bloqueio da via colinérgica, evidenciadas tanto nos animais VACht KD quanto nos animais tratados com a mecamilamina ou vagotomizados, e considerando que após bloqueio da via colinérgica o mesWAT destes animais apresentou aumento nas populações efetoras, avaliamos também se a redução de sinalização pela via colinérgica poderia causar alterações metabólicas nestes animais visto que leucócitos residentes de tecido adiposo branco são essenciais para o controle metabólico deste tecido. Para isso, utilizamos animais VACht KD em um modelo de desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica. Submetemos os animais a 20 semanas de HFD, utilizando animais WT como controle. O peso destes animais foi aferido semanalmente e, após as 20 semanas, os animais foram avaliados em relação a: tolerância à insulina, tolerância à glicose, metabolismo oxidativo (VO_2), ingesta alimentar, e quantidade de massa gorda e massa magra.

Os animais VACht KD mostraram ganho de peso significativamente reduzido em ambas as dietas, controle ou HFD, em relação aos animais WT (Figura 22 A). Isso também foi observado na análise de porcentagem de ganho de peso. Animais VACht KD, proporcionalmente, engordaram menos em relação aos animais controle (Figura 22 B). Após 20 semanas de dieta, fizemos os testes de ITT e GTT a fim de avaliar a resposta à glicose e insulina. Todos os animais tratados com a HFD apresentaram resistência à insulina e à glicose quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Porém, quando comparamos os grupos VACht e WT, percebemos que a resposta dos animais VACht à insulina e o clearance de glicose parecem ser melhores do que nos controles, o que é evidenciado no gráfico de porcentagem de queda glicêmica no ITT e no clearance de glicose após o tempo 60 min no GTT (Figura 22 C, D, F, G). Não observamos diferenças na glicemia de jejum dos animais nos tempos 6 e 12h (Figura 22 E, H). Estes resultados sugerem que a redução do tônus da via colinérgica pode impactar positivamente no metabolismo destes animais.

Na sequência, analisamos a massa dos depósitos de gordura destes animais por ressonância magnética. Percebemos que, em gramas, os animais VACht

Resultados

apresentaram significativamente menos massa gorda em relação aos animais WT. Porém, proporcionalmente, eles acumularam quantidade semelhante aos WT após administração da HFD. O mesmo ocorreu para o número absoluto e porcentagem de massa magra (Figura 23 A, B, C). Também quantificamos a massa gorda dos animais por radiografia. Visualmente, os animais VACht HFD apresentaram menor área de gordura corporal que os animais WT alimentados com a mesma dieta (Figura 23 F). Para avaliar o metabolismo basal destes animais, os submetemos a análise por calorimetria. Percebemos que os animais WT e VACht alimentados com dieta controle apresentaram níveis similares de VO_2 . Porém, entre os grupos HFD, verificamos que os animais WT alimentados com a HFD tiveram queda evidenciada no VO_2 , o que não ocorreu nos animais VACht tratados com a HFD (Figura 23 D). Para confirmar que todos os efeitos observados não eram causados por diferenças na ingestão alimentar destes animais, pesamos diariamente a ração dos grupos controle e HFD. Não houve diferença entre os grupos (Figura 23 E). Após eutanásia, pesamos os depósitos de tecido adiposo. Em suma, animais VACht na dieta HFD acumularam menos massa de gordura nos tecidos scWAT, mesWAT, pgWAT e BAT em comparação com o grupo controle (Figura 23 G, H, I, J). Esses dados demonstram que, além de ganharem menos peso, os animais VACht acumulam menos depósitos de gordura no organismo, em relação aos animais WT.

O scWAT, pgWAT, BAT e o fígado destes animais foram analisados por histologia. Usou-se coloração por HE para visualização dos adipócitos nos tecidos ou depósitos de gordura no fígado. Verificamos que a dieta hiperlipídica foi capaz de causar alterações em todos os tecidos dos animais em comparação ao controle, como aumento em tamanho dos adipócitos, “branqueamento” do tecido adiposo marrom e esteatose hepática. Porém, todos estes efeitos foram menos evidenciados nos animais VACht KD tratados com a HFD. Houve menor deposição de lipídios, tanto no scWAT quanto no pgWAT destes animais em comparação ao grupo WT HFD, evidenciado pelo tamanho médio dos adipócitos (Figura 24 A – H; Q, R, S, T). Os animais VACht KD alimentados com a HFD também apresentaram menos “branqueamento” do BAT, em comparação ao controle alimentado com a mesma dieta (Figura 24 C). Também observamos menos focos de esteatose nos fígados dos animais VACht KD alimentados com a HFD, quando comparados ao controle HFD (Figura 24 D).

Resultados

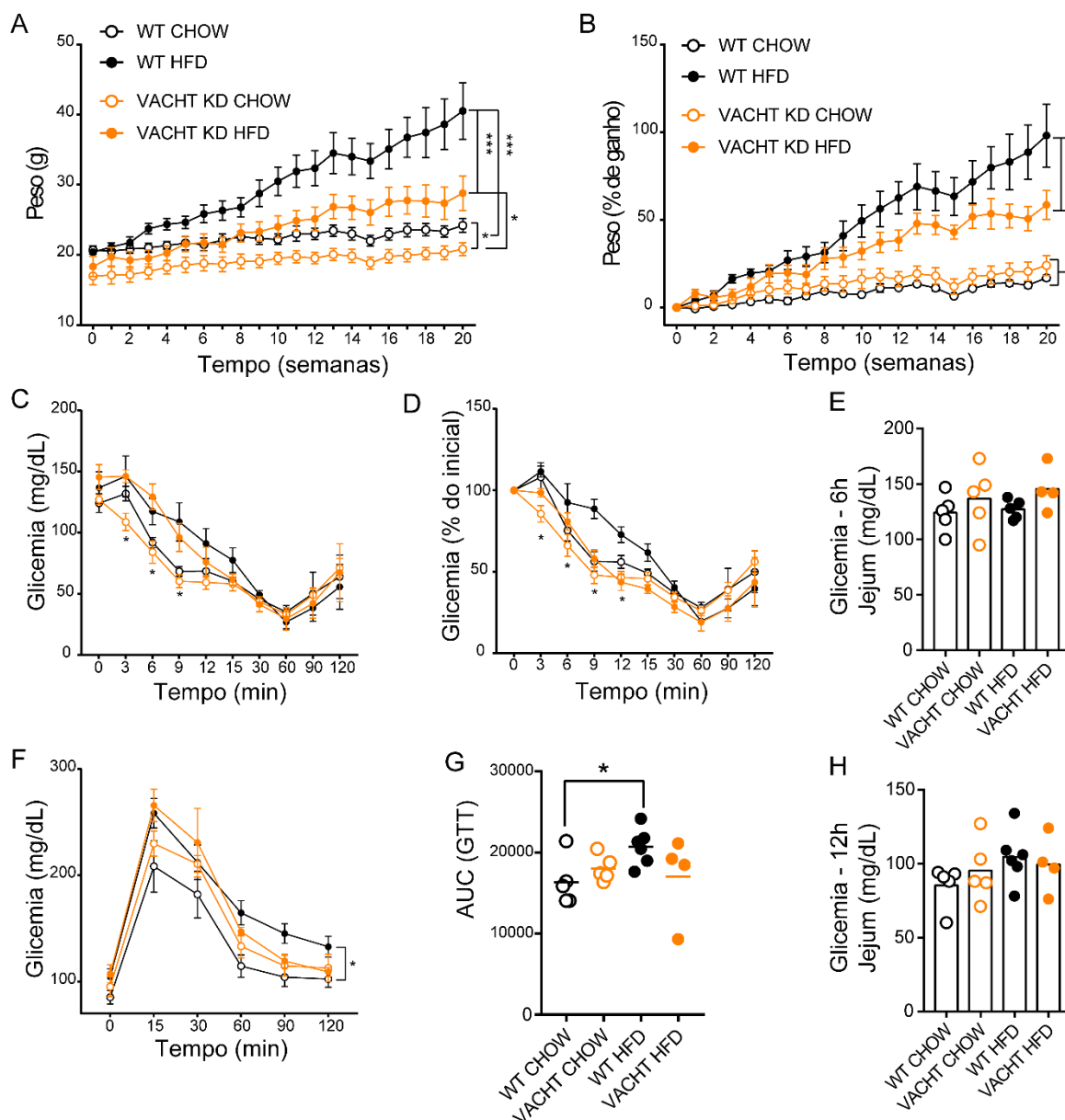


Figura 22 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos C57BL/6 WT e VACht KD foram tratados com dieta controle (Chow) ou hiperlipídica (HFD). (A) Peso semanal em gramas e (B) porcentagem de ganho de peso dos animais ao decorrer de 20 semanas de tratamento com as dietas. (C, D) Teste de tolerância à insulina – ITT e gráfico da porcentagem; (E) Glicemia após 6h em jejum; (F, G) Teste de tolerância à glicose – GTT e gráfico da área sob a curva – AUC do GTT; (H) Glicemia após 12h em jejum. Todos os testes foram realizados após 20 semanas de início da dieta. Resultados representativos de um experimento. Gráficos representados com o erro padrão da média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Resultados

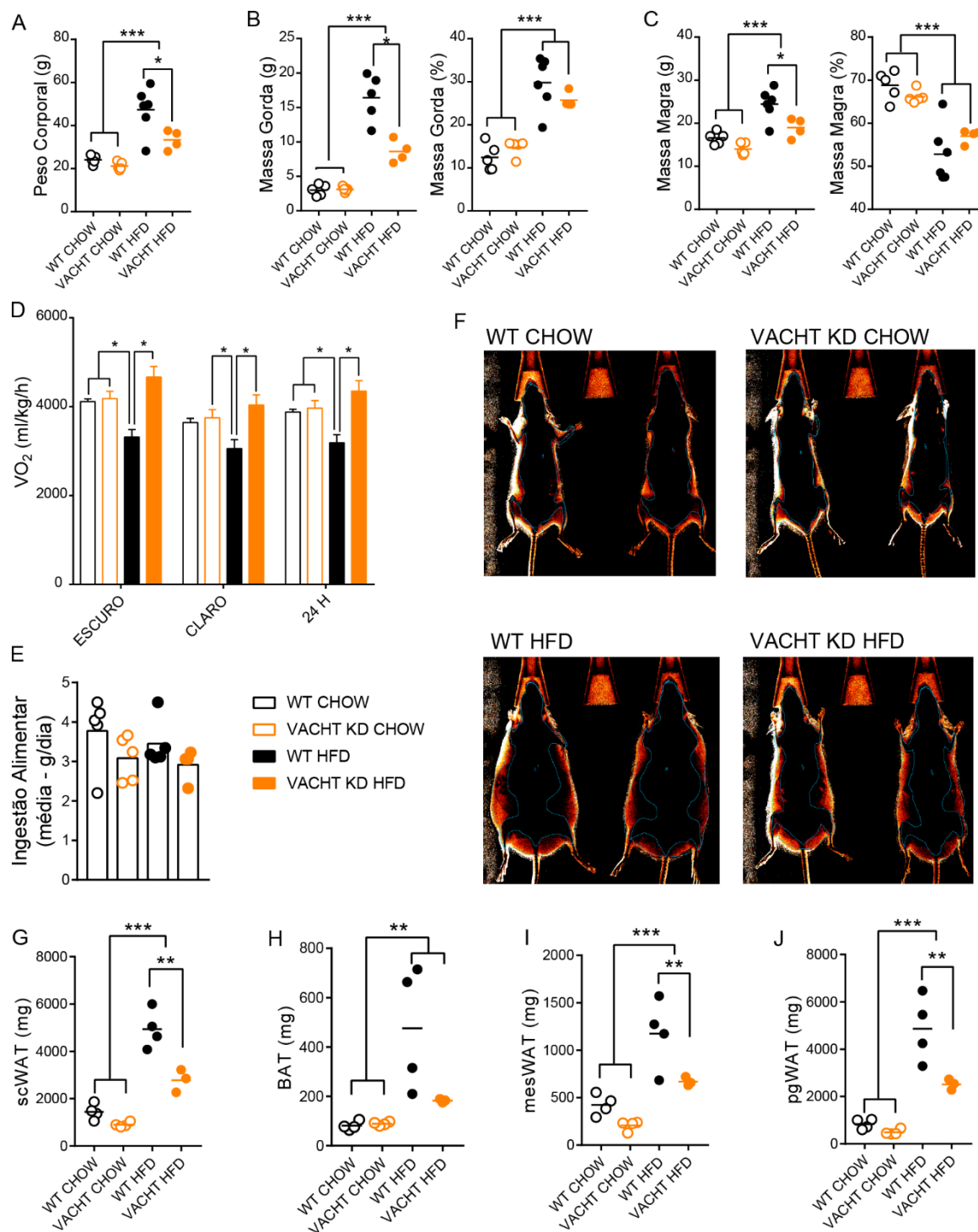


Figura 23 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos C57BL/6 WT e VACht KD foram tratados com dieta controle (CHOW) ou hiperlipídica (HFD). (A) Peso corporal em gramas e (B, C) porcentagem e número absoluto de massa gorda e massa magra, em gramas; (D) VO_2 dos animais, obtido por análise de calorimetria; (E) ingestão alimentar; (F) imagem de radiografia obtida por FX-PRO dos animais mostrando a diferença de massa gorda, em vermelho; (G-J) peso dos tecidos adiposos pós-eutanásia. Resultados representativos de um experimento. Gráficos representados com o erro padrão da média. Os gráficos de barra representam a média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Resultados

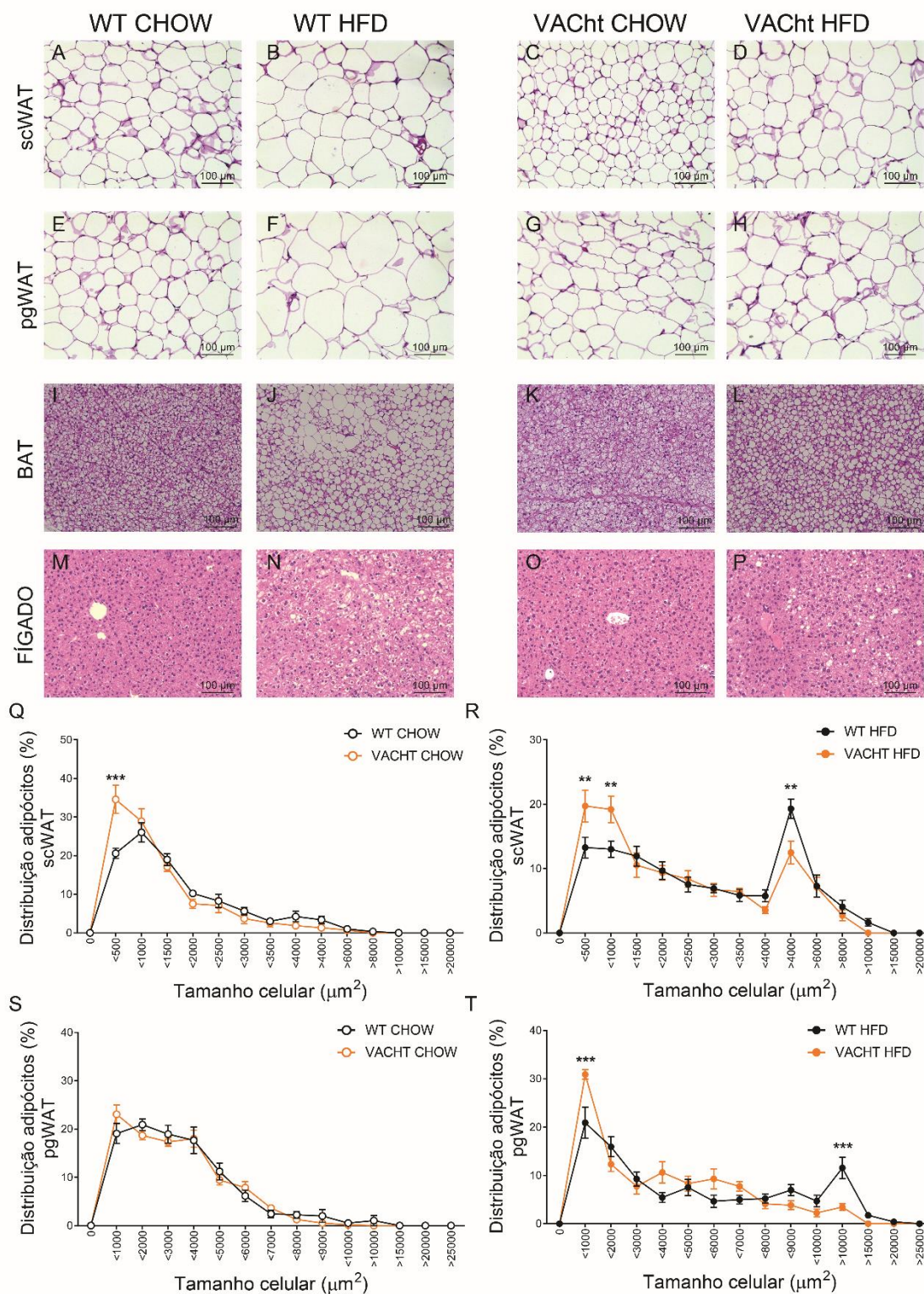


Figura 24 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais WT e VACht KD tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos C57BL/6 WT e VACht KD foram tratados com dieta controle (Chow) ou hiperlipídica (HFD) por 20 semanas. (A - D) scWAT, (E - H) pgWAT, (I - L) BAT e (M - P) fígado de animais WT ou VACht K.D; (Q - R) Tamanho médio dos adipócitos presentes no scWAT ou (S - T) no pgWAT dos animais WT ou VACht KD sob dieta controle ou hiperlipídica. Os animais foram eutanasiados após 20 semanas de tratamento com as dietas CHOW ou HFD. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos representam o erro padrão da média. *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,001.

4.5 – Perfil metabólico de animais tratados com mecamilamina submetidos à dieta hiperlipídica

Para confirmar os dados observados nos animais transgênicos, observamos se os mesmos efeitos metabólicos eram vistos na inibição farmacológica da via colinérgica, utilizando a mecamilamina. Para isso, condicionamos os animais a 15 semanas de dieta hiperlipídica (HFD). Durante as 4 últimas semanas de dieta, os animais foram tratados com o antagonista, e os grupos controle tratados somente com salina. O peso destes animais foi aferido durante as 15 semanas, e avaliamos após este período a tolerância à insulina, tolerância à glicose e o peso dos tecidos adiposos após eutanásia.

Quanto ao peso dos animais, observamos que os animais alimentados com a HFD ganharam mais peso em comparação aos animais na dieta controle, independentemente o tratamento farmacológico. Nos animais que tiveram a inibição farmacológica da via, não houve diferença no ganho de peso em relação aos grupos não tratados (Figura 25 A e B). A resposta à glicose e insulina dos animais foi avaliada após 14 semanas de dieta. Pudemos observar uma redução brusca no peso dos animais tratados com a HFD na semana em que estas análises foram feitas, como pode ser observado nas regiões indicadas pelas setas (Figura 25 A e B). Houve diferenças significativas somente entre os grupos alimentados com a HFD e os alimentados com dieta controle, indicando que os animais obesos ficam mais resistentes à glicose e à insulina. Não verificamos diferenças significativas no ITT ou GTT entre os animais tratados ou não com a mecamilamina. O mesmo ocorreu nestes grupos quando observamos as glicemias de jejum (Figura 25 C, D, E, F, G, H).

O scWAT, BAT e pgWAT foram pesados no momento da eutanásia. Constatamos que os animais alimentados com a dieta HFD possuíam mais massa de tecidos adiposos se comparados aos alimentados com a dieta controle. Porém, os animais tratados com a mecamilamina não apresentaram diferença significativa no peso destes tecidos em relação aos animais tratados somente com a salina (Figura 26 A, B, C).

Resultados

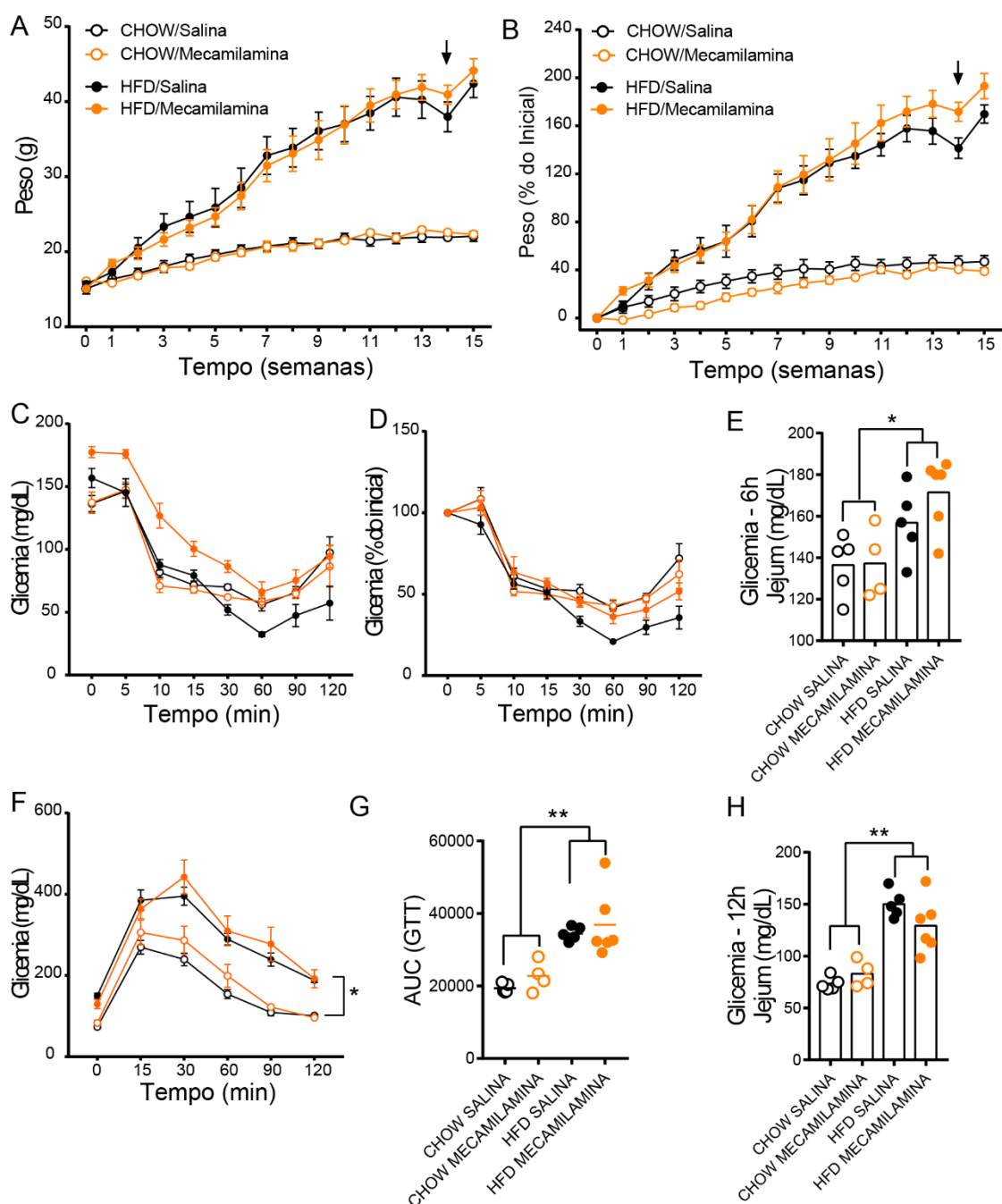


Figura 25 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.

(A) Peso semanal em gramas e (B) porcentagem de ganho de peso dos animais ao decorrer de 15 semanas de tratamento com as dietas. (C, D) Teste de tolerância à insulina – ITT e gráfico da porcentagem; (E) Glicemia após 6h em jejum; (F, G) Teste de tolerância à glicose – GTT e gráfico da área sob a curva – AUC do GTT; (H) Glicemia após 12h em jejum. O tratamento com o inibidor colinérgico iniciou-se na oitava semana. Todos os testes foram realizados após 14 semanas de início da dieta (as setas indicam a semana em que os testes foram realizados). Resultados representativos de um experimento. Gráficos representados com o erro padrão da média. Os gráficos de barra representam a média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Resultados

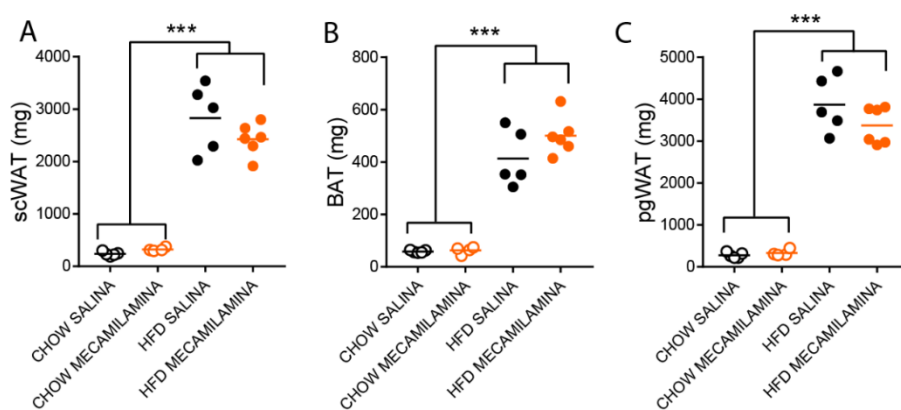


Figura 26 – Peso dos tecidos adiposos de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.

(A, B, C) Peso dos tecidos adiposos pós-eutanásia. Resultados representativos de um experimento. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Fizemos estas mesmas análises em animais tratados com a nicotina, um agonista colinérgico. Vimos que os animais alimentados com a HFD ganharam mais peso em comparação aos animais na dieta controle; porém, não houve diferença no ganho de peso em relação aos grupos tratados/não tratados com a nicotina (Material Suplementar 3 e 4). Quando analisamos a resposta à insulina e à glicose, observamos que, em relação ao grupo salina/HFD, os animais tratados com a nicotina que se alimentavam de HFD apresentaram maior resistência à insulina e clearance de glicose comprometido, apesar de não ter havido diferenças na glicemia de jejum entre os grupos tratados com a droga em relação aos grupos controle. Estes resultados demonstram que, mesmo não havendo diferença significativa nos testes metabólicos de animais tratados com o inibidor colinérgico, o estímulo da via pela nicotina aumentou a resistência à glicose e insulina nestes animais.

O scWAT, pgWAT, BAT e o fígado destes animais foram analisados por histologia, por coloração por HE. Não verificamos diferença visual ou quantitativa expressiva entre os grupos tratados com salina ou mecamilamina no scWAT, pgWAT ou no BAT destes animais submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 27 A – H; Q, R, S, T). Entretanto, os cortes histológicos do fígado de animais tratados com o inibidor e submetidos à HFD possuem menos esteatose que os animais tratados apenas com salina, na mesma dieta (Figura 27 D). Estes resultados sugerem que a via colinérgica pode estar relacionada ao acúmulo de lipídios em outros tecidos viscerais, como o fígado, e a inibição da via com a mecamilamina parece ser capaz de reverter estes efeitos.

Resultados

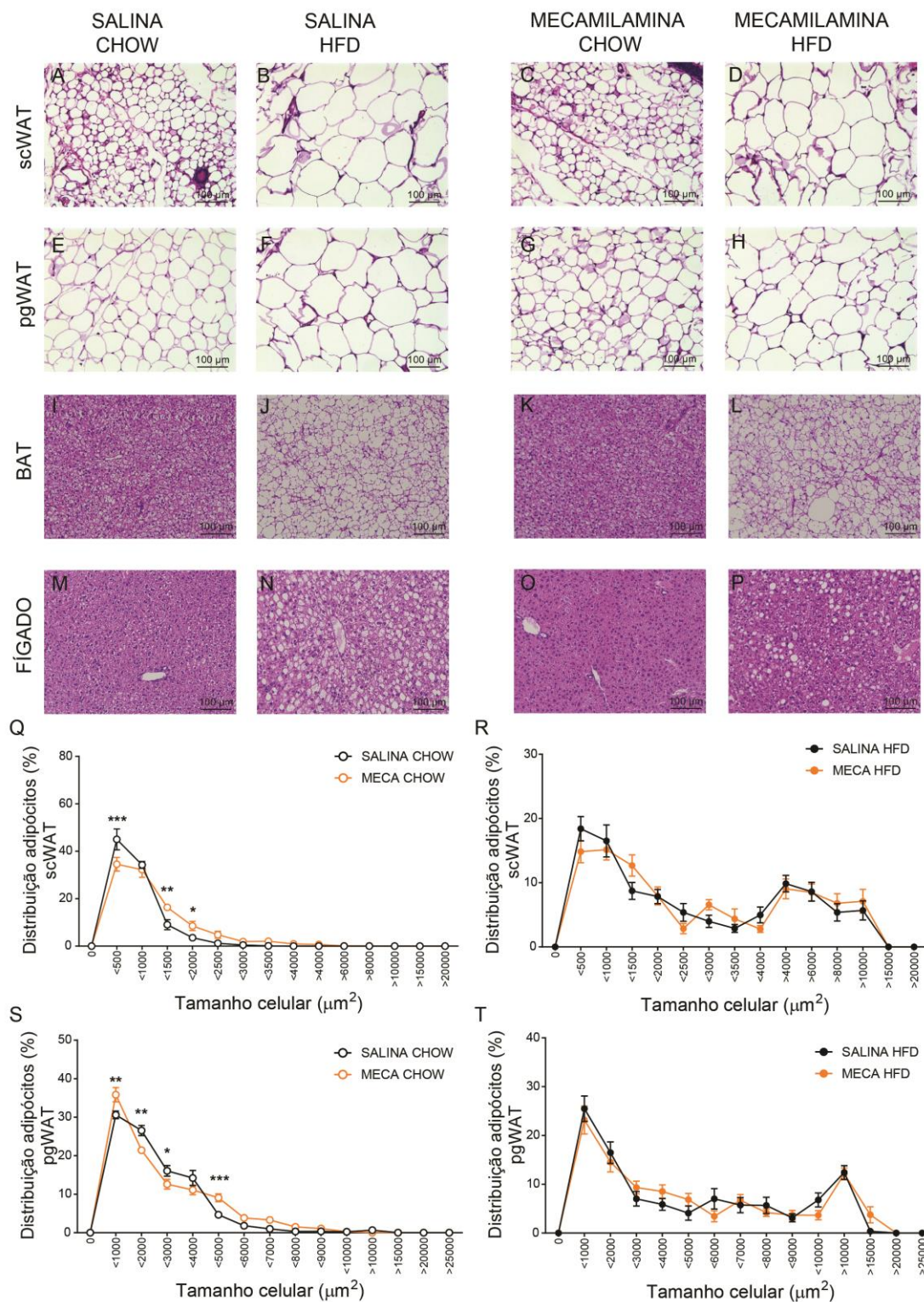


Figura 27 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais com inibição farmacológica da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica.

(A - D) scWAT, (E - H) pgWAT, (I - L) BAT e (M - P) fígado de animais tratados com salina ou mecamilamina (MECA) submetidos a dieta CHOW ou HFD; (Q - R) Tamanho médio dos adipócitos presentes no scWAT ou (S - T) no pgWAT dos animais tratados com salina ou MECA sob dieta controle ou hiperlipídica. Os animais foram eutanasiados após 15 semanas de tratamento com as dietas CHOW ou HFD. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.6 – Perfil metabólico de animais vagotomizados submetidos à dieta hiperlipídica

Utilizamos também o modelo de vagotomia unilateral para avaliação do fenótipo metabólico. Camundongos vagotomizados (VgX) ou controle (Sham) foram tratados com dieta padrão (Chow) ou HFD (Figura 28). Quando analisamos o peso dos animais durante o tratamento com as dietas, verificamos um aumento significativo no peso corporal e na porcentagem de ganho de peso nos dois grupos tratados com HFD (Sham/HFD e VgX/HFD), em relação aos grupos que receberam dieta controle (Sham/Chow e VgX/Chow). Porém, o grupo VgX, quando submetido à HFD, teve ganho de peso reduzido em relação ao grupo não operado (Figura 28 A-B). Estes resultados indicam que a inibição da via colinérgica parece ser capaz de influenciar no ganho de peso dos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica.

Para analisar as mudanças metabólicas causadas pela obesidade nos animais Sham e VgX, foram avaliados na 20^a semana após administração das dietas, os perfis de resposta à insulina e tolerância à glicose através dos testes de ITT e GTT, respectivamente. Podemos observar que, ambos os grupos submetidos à dieta HFD, tanto Sham quanto VgX, apresentaram fenótipo de resistência à insulina (Figura 28 C). Percebemos que, no teste de tolerância à insulina, não houve diferença significativa entre os grupos controle e vagotomizados. Porém, quando avaliamos a porcentagem de alteração dos níveis glicêmicos após injeção de insulina, percebemos que o grupo Sham submetido à dieta hiperlipídica tem maior dificuldade em realizar o clearance de glicose em comparação aos animais VgX submetidos à mesma dieta (Figura 28 D).

Realizamos também o teste de tolerância à glicose nos grupos experimentais (Figura 28 F). Diferentemente do teste de ITT, encontramos um aumento significativo na intolerância à glicose no grupo VgX que recebeu HFD em relação ao grupo Sham na mesma dieta, o que também pode ser evidenciado no gráfico de AUC (Figura 28 G). Quando analisamos separadamente as glicemias de jejum dos animais, medida a 6h de jejum no teste de ITT e 12h no GTT (Figura 28 E, H), verificamos que após 6h de jejum, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 28 E). Porém, após 12h de jejum, observamos diferença significativa entre os grupos tratados com a dieta HFD e os animais na dieta controle (Figura 28 H).

Resultados

Para melhor avaliação das funções metabólicas basais, na 20ª semana após cirurgia e início das dietas, os animais foram anestesiados e submetidos a análises da proporção de gordura corporal e de calorimetria. Verificamos que houve diferença significativa na área de gordura corporal entre os animais com dieta controle e hiperlipídica (Figura 29 A-C). Ainda constatamos que os animais vagotomizados alimentados com a dieta hiperlipídica exibiram uma redução significativa na porcentagem de gordura corpórea em relação ao respectivo grupo Sham (Figura 29 B-C). Com estes dados, avaliamos se os animais apresentavam este fenótipo por diferenças no comportamento alimentar. O gráfico de ingestão alimentar, ou do inglês *food intake*, pode ser visto na Figura 29 D-E. Pudemos ver que não há diferença significativa na ingestão alimentar média diária dos animais, alimentados com a dieta controle ou hiperlipídica. Os animais também foram submetidos a análises calorimétricas para avaliação do metabolismo basal. Percebemos que, apesar de haver diferença nítida do metabolismo basal de animais alimentados com a dieta controle ou HFD, no RER, VO₂ ou VCO₂, não há diferença significativa entre os animais Sham ou VgX (Figura 29 F-H). Da mesma forma, houve diferença na capacidade de movimentação e taxa ambulatorial dos animais obesos em relação aos animais magros, mas não houve diferença significativa entre os grupos Sham e VgX (Figura 29 I).

Resultados

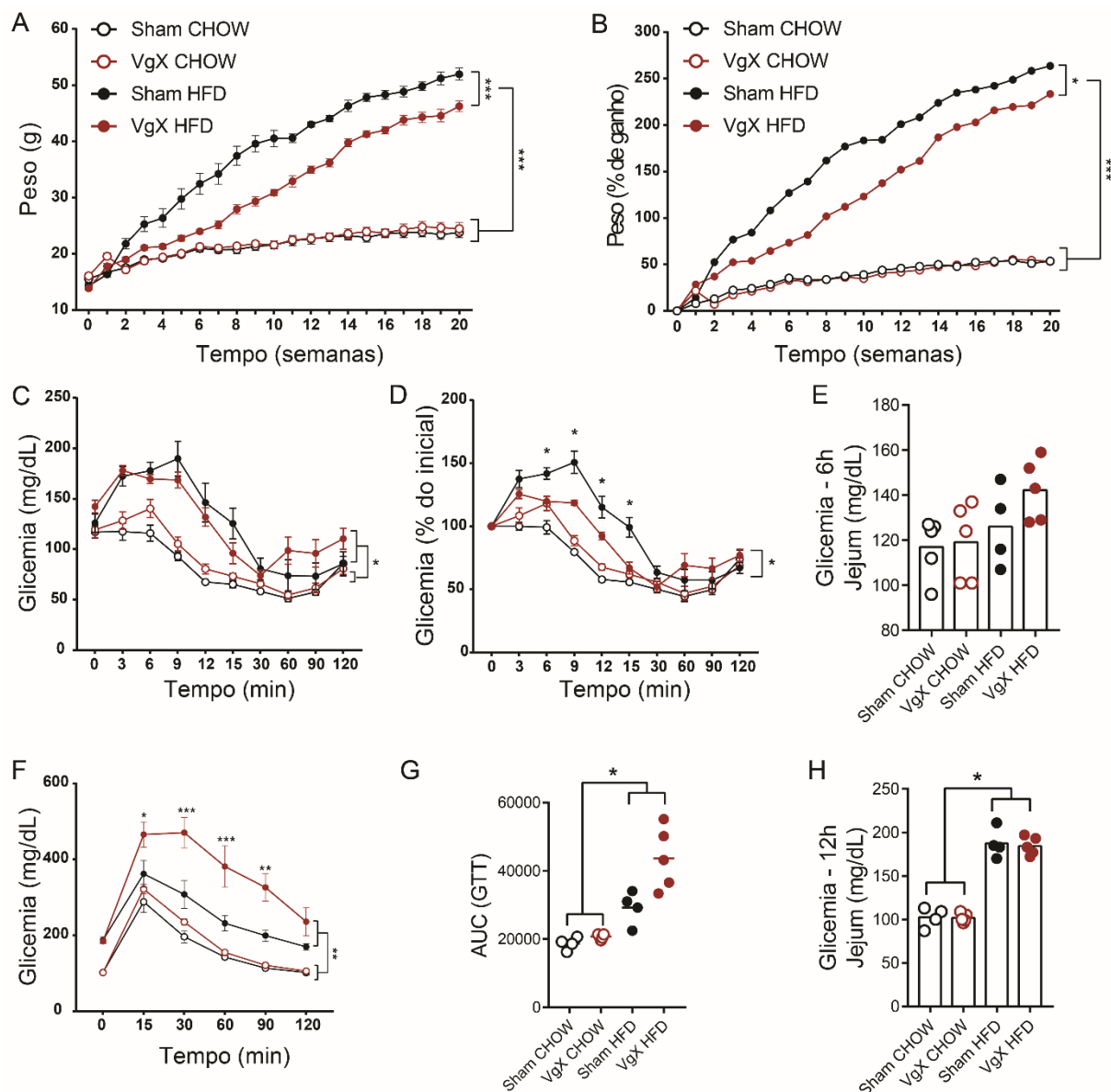


Figura 28 – Peso corpóreo e o perfil metabólico de animais vagotomizados e tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos C57BL/6 foram vagotomizados (VgX) e, em seguida tratados com dieta controle (Chow) ou hiperlipídica (do inglês, High Fat Diet - HFD). Como controle experimental, dois grupos de animais foram submetidos à cirurgia sem a excisão do nervo (grupo Sham) e tratados com dietas Chow ou HFD. (A) Peso semanal em gramas e (B) porcentagem de ganho de peso dos animais ao decorrer de 20 semanas de tratamento com as dietas. (C-D) Teste de tolerância à insulina – ITT e gráfico da variação em porcentagem em relação ao tempo da administração da insulina; (E) Glicemia após 6h em jejum; (F-G) Teste de tolerância à glicose – GTT e gráfico da área sob a curva – AUC (do inglês, *area under curve*) do GTT; (H) Glicemia após 12h em jejum. Os testes foram realizados após 20 semanas de início da dieta. Resultados representativos de um experimento, n=4-5 animais por grupo. *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,001.

Resultados

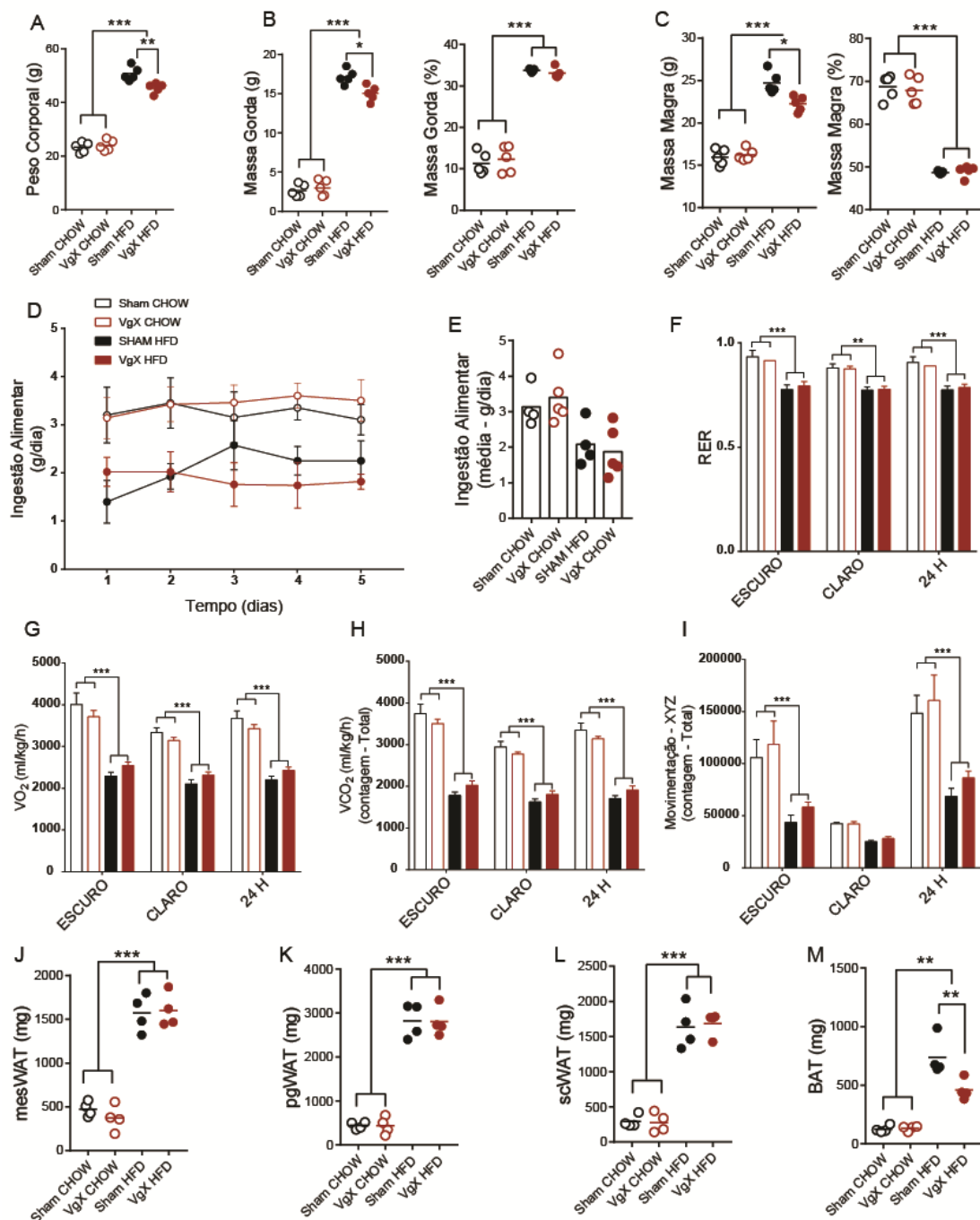


Figura 29 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VgX tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos Sham e VgX foram tratados com dieta controle (CHOW) ou hiperlipídica (HFD). (A) Peso corporal em gramas no momento da análise e (B, C) porcentagem e número absoluto de massa gorda e massa magra, em gramas; (D, E) Ingestão alimentar diária e média diária; (F) RER (do inglês, *respiratory exchange ratio*), (G) VO_2 , (H) VCO_2 e (I) movimentação total na caixa dos animais, obtido por análise de calorimetria; (J-M) peso dos tecidos adiposos pós-eutanásia. Resultados representativos de um experimento. Gráficos representados com o erro padrão da média. Os gráficos de barra representam a média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Resultados

Após a eutanásia dos animais na 20^a semana de experimento, os principais depósitos de tecido adiposo foram coletados e pesados: mesWAT, pgWAT, scWAT e BAT (Figura 29 J-M). Percebemos que, da mesma forma do que foi observado na análise por densitometria, a diferença na gordura corpórea é significativamente evidente entre os grupos submetidos à dieta controle e os submetidos à dieta HFD. Além disso, o peso do tecido adiposo marrom (BAT) variou entre os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (Figura 29 M). Observamos que os animais VgX apresentaram menor peso neste tecido em relação aos Sham alimentados com a mesma dieta. Isso pode ser explicado pela redução do processo de ‘branqueamento’ no tecido adiposo dos animais após cirurgia de vagotomia unilateral. Porém, não foi observada diferença entre os grupos Sham e os grupos vagotomizados, assim como nos dados anteriores.

O scWAT, pgWAT, BAT e o fígado destes animais foram submetidos à análise histológica, por coloração de HE. Verificamos que a dieta hiperlipídica foi capaz de causar alterações já descritas anteriormente, como aumento em tamanho dos adipócitos, “branqueamento” do tecido adiposo marrom e esteatose hepática. Todavia, estes efeitos foram menos pronunciados em animais submetidos à vagotomia unilateral tratados com a HFD. Houve menor deposição de lipídios, tanto no scWAT quanto no pgWAT dos animais VgX HFD em comparação ao grupo SHAM HFD (Figura 30 A e B). Os animais vagotomizados alimentados com a HFD também apresentaram menos “branqueamento” do BAT, em comparação ao controle alimentado com a mesma dieta (Figura 30 C). Também observamos menos esteatose hepática em animais VgX alimentados com a HFD, quando comparados ao controle HFD (Figura 30 D). Estes dados, em conjunto, indicam a importância da via colinérgica para manutenção celular e metabólica do tecido adiposo e de outros tecidos, como fígado.

Resultados

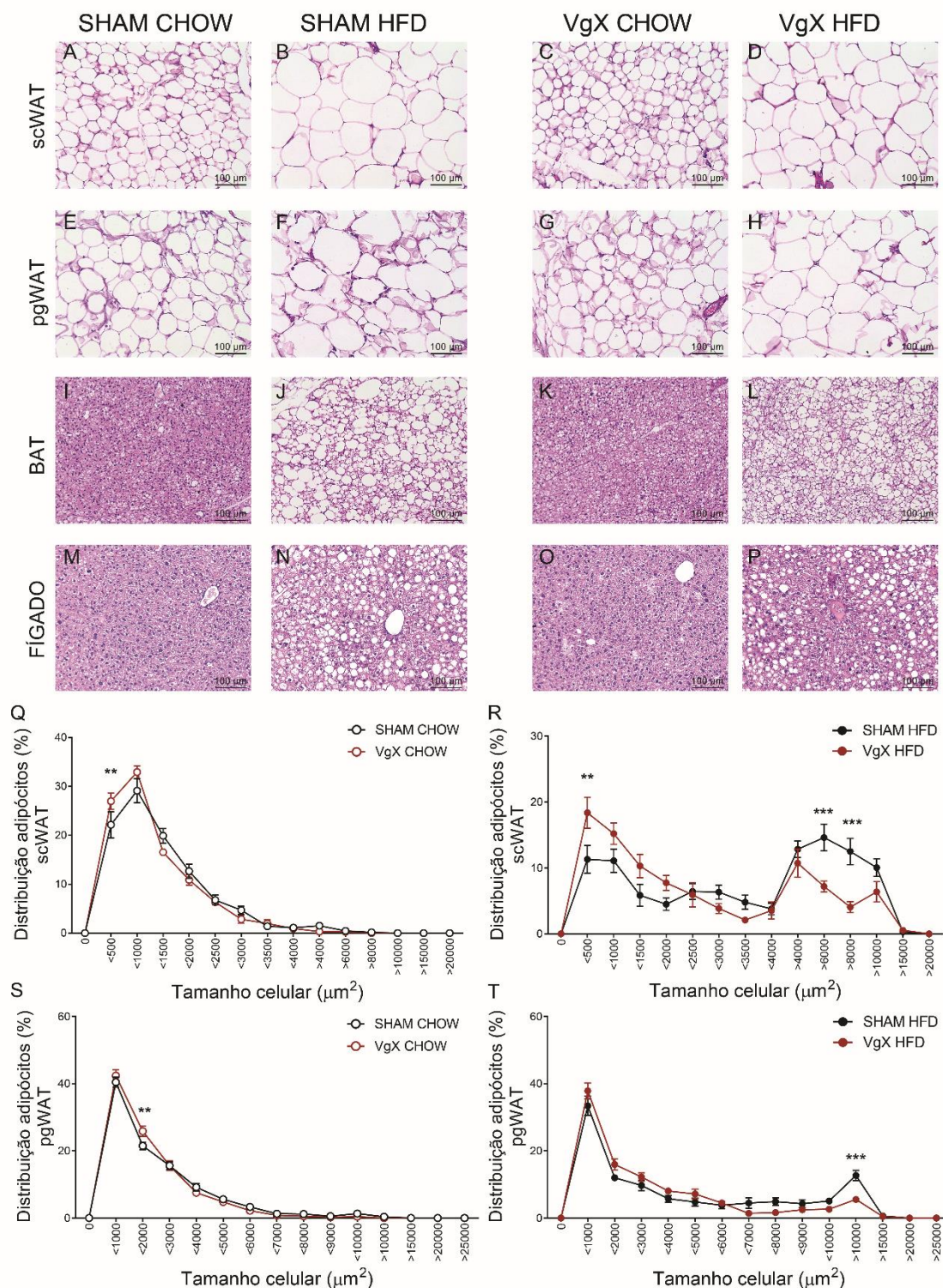


Figura 30 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais SHAM e VgX tratados com dieta hiperlipídica.

Camundongos SHAM e VgX foram tratados com dieta controle (Chow) ou hiperlipídica (HFD) por 20 semanas. (A - D) scWAT, (E - H) pgWAT, (I - L) BAT e (M - P) fígado de animais WT ou VAgT K.D; (Q - R) Tamanho médio dos adipócitos presentes no scWAT ou (S - T) no pgWAT dos animais SHAM e VgX sob dieta controle ou hiperlipídica. Os animais foram eutanasiados após 20 semanas de tratamento com as dietas CHOW ou HFD. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos representam o erro padrão da média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.7 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de animais obesos após bloqueio da via colinérgica

Considerando os efeitos observados nas diferentes populações celulares no tecido adiposo após bloqueio da via colinérgica, decidimos avaliar se a inibição desta via impactava também em diferença de celularidade em animais obesos, após administração de dieta hiperlipídica. A obesidade está diretamente relacionada a mudanças nas populações celulares do tecido adiposo, polarizando o mesmo para um perfil pró-inflamatório, com aumento de macrófagos inflamatórios, aumento da sinalização via NF- κ B e das células efectoras no tecido (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Levando em consideração as mudanças observadas no tecido dos animais sob dieta controle após o bloqueio da via, imaginamos que as alterações causadas nas populações, principalmente as relacionadas ao perfil Th2, poderiam impactar nas populações celulares dos diferentes depósitos de tecido adiposo, principalmente os viscerais, após administração de dieta hiperlipídica. Para isso, após administração de dieta hiperlipídica, avaliamos as células presentes no tecido adiposo mesentérico e subcutâneo de animais em dois modelos de bloqueio da via colinérgica.

Primeiro, avaliamos o mesWAT e scWAT de animais VACht KD alimentados por 20 semanas com dieta controle ou hiperlipídica. Quanto ao tecido adiposo mesentérico, não houve aumento significativo no número de leucócitos CD45⁺ totais em animais WT submetidos à dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle CHOW. Porém, o número total de células apresenta tendência à redução nos animais VACht KD, em ambas as dietas (Figura 31 A). Observamos que, no mesWAT dos animais WT HFD, houve aumento de neutrófilos, células dendríticas inflamatórias (CD11b⁺) e monócitos; porém, o mesmo aumento não foi visto nos animais VACht KD submetidos à mesma dieta (Figura 31 E). No scWAT, houve aumento significativo nas células CD45⁺ totais no grupo WT HFD, mas não no grupo VACht na mesma dieta (Figura 31 G). Além disso, houve aumento no número relativo de células dendríticas CD11b⁺ e monócitos nos animais WT submetidos à dieta hiperlipídica, mas não nos animais VACht KD sob a mesma dieta (Figura 31 H-L).

Resultados

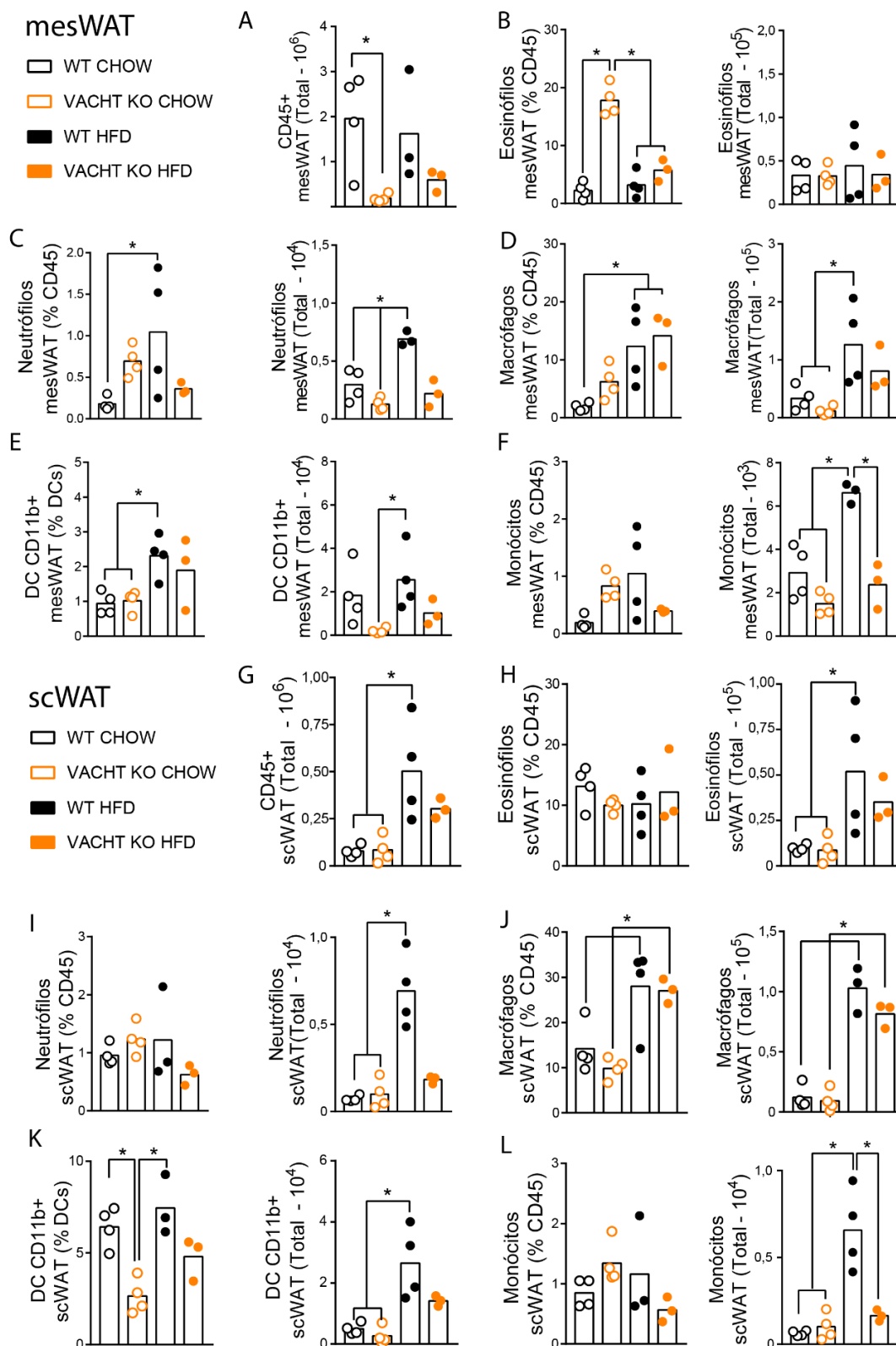


Figura 31 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) caracterização das células CD45 totais e mieloides presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT) e (G-L) subcutâneo (scWAT) de animais WT e VACht, submetidos à dieta hiperlipídica. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos de barra representam a média. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

Nas populações linfoides, houve aumento de ILCs no mesWAT de animais VACht KD submetidos à HFD em relação aos controles WT (Figura 32 A). Como já avaliado anteriormente, houve redução nas populações de células T nos mesentérios de animais VACht KD na dieta controle; porém, essas mudanças não se refletiram nos animais do mesmo grupo submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 32 B). Em relação à produção de citocinas, houve aumento da produção das citocinas IL-5 e IL-13 pelos animais VACht KD em ambas as dietas, em relação aos animais WT (Figura 32 C, E). As células T CD4⁺ no mesentério de animais VACht KD na dieta Chow foram capazes de aumentar a produção de IL-5 e IL-13, mas isso não ocorreu nos mesmos quando submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 32 D, F). No tecido adiposo subcutâneo, houve aumento no número absoluto de ILCs e células TCD4⁺ no grupo WT HFD, comparado ao controle. Porém, tal aumento não foi visto nos animais VACht KD submetidos à mesma dieta (Figura 32 A, B). Houve também aumento da produção das citocinas IL-5 e IL-13 por estas células em número absoluto, nos animais do grupo WT HFD; porém isto não foi observado nos animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 32 C-F). Ademais, a diferença vista no número total de células reflete as mudanças vistas na população CD45⁺ total (Figura 32 G).

Resultados

mesWAT WT CHOW VACHT KD CHOW WT HFD VACHT KD HFD

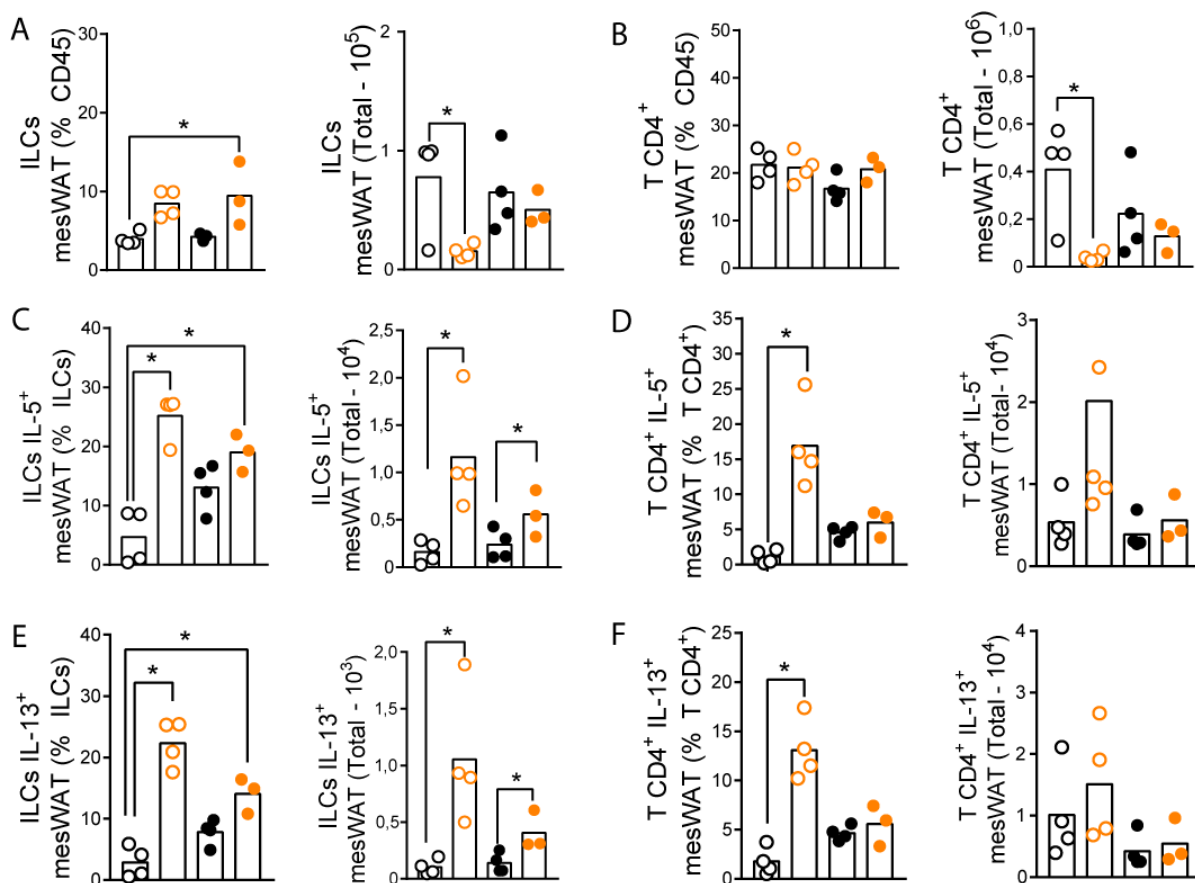


Figura 32 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do mesWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) Perfil de produção de citocinas pelas células T e ILCs no tecido adiposo mesentérico (mesWAT) de animais WT ou VACht KD sob dieta controle ou hiperlipídica. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IL-5 e IL-13. O tecido foi analisado de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

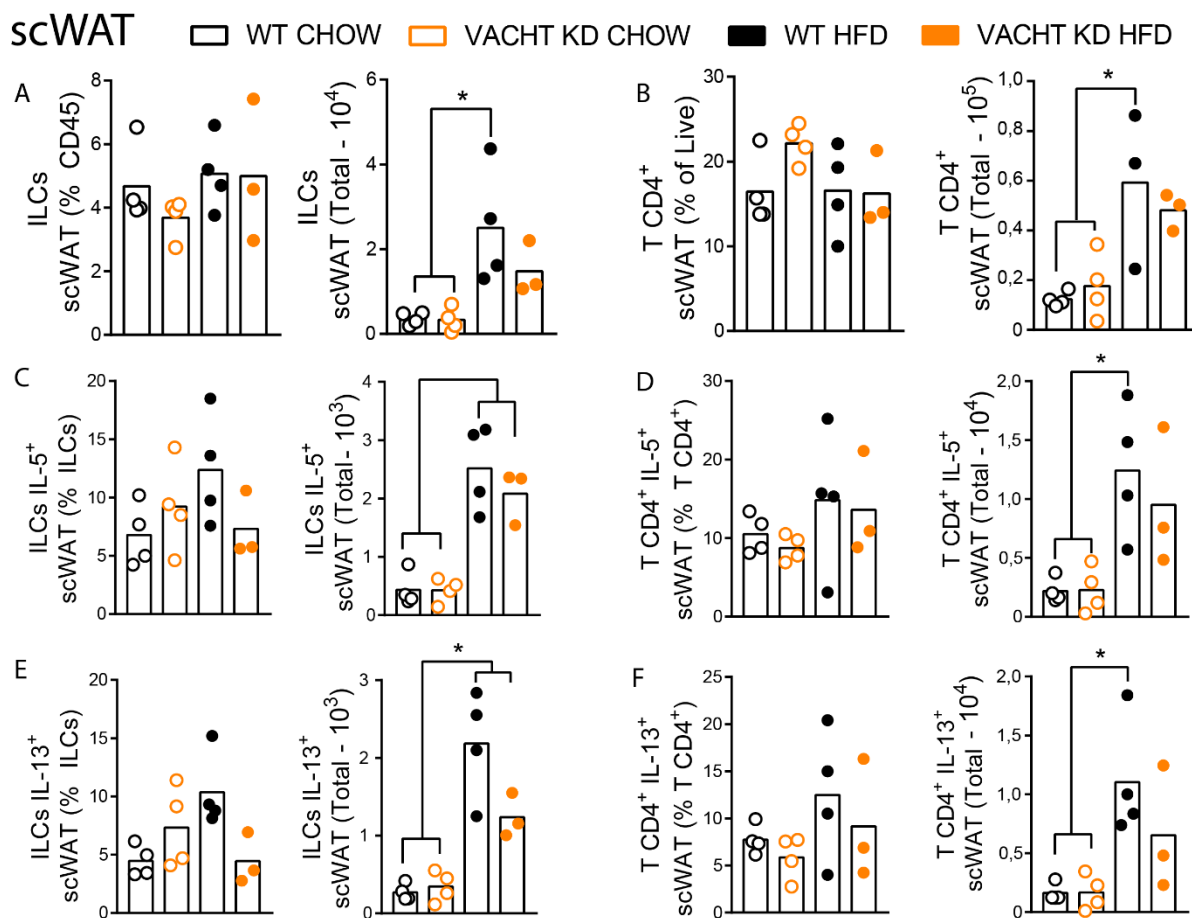


Figura 33 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do scWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) Perfil de produção de citocinas pelas células T e ILCs no tecido adiposo subcutâneo (scWAT) de animais WT ou VACht KD sob dieta controle ou hiperlipídica. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IL-5 e IL-13. O tecido foi analisado de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Considerando as mudanças observadas tanto no mesWAT quanto no scWAT, em relação às populações celulares e produção de citocinas, utilizamos outro modelo experimental para avaliar as mudanças que ocorriam no tecido adiposo de animais com bloqueio da via colinérgica submetidos à dieta hiperlipídica. Em seguida, analisamos a celularidade no tecido adiposo de animais vagotomizados submetidos à dieta hiperlipídica. Observamos que, nos animais Sham submetidos à dieta hiperlipídica, há aumento da população CD45⁺ tanto no mesWAT quanto no scWAT destes animais em relação aos grupos na dieta controle (Figura 33 A, G). Porém, após vagotomia unilateral, observamos diminuição da população CD45⁺ somente no mesWAT dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, em relação ao grupo Sham na

Resultados

mesma dieta (Figura 34 A). Essa diferença culminou com diminuição no número absoluto de todas as populações celulares no mesentério destes animais, de maneira importante, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas inflamatórias e monócitos. (Figura 34 B – F). Já no tecido adiposo subcutâneo, não foi observada diminuição no número absoluto das células CD45⁺. Observamos também que os animais vagotomizados submetidos à dieta hiperlipídica não apresentaram diferença estatística no número relativo e absoluto de neutrófilos em comparação aos animais controle, ao contrário dos animais Sham submetidos à mesma dieta, que apresentaram aumento na população (Figura 34 I).

Também avaliamos as células linfóides nos tecidos destes animais e a produção de citocinas por elas. No tecido adiposo mesentérico, não observamos diferença relativa nas populações de origem linfóide, ILCs ou células T CD4. Porém, observamos diferença no número absoluto de todas as populações celulares, justificada pela diferença já descrita na população CD45⁺ (Figura 35 A-F). Em relação ao perfil de produção de citocinas, observamos que, no mesWAT destes animais, houve diminuição das citocinas IL-13 e IL-5 no mesentério de animais obesos. Porém, a citocina IL-5 diminuiu significativamente somente nos animais Sham submetidos à dieta hiperlipídica, mas não nos animais vagotomizados, em relação ao controle CHOW (Figura 35 C). Houve diminuição de produção das citocinas IL-5 e IL-13 pelas células T CD4⁺ dos animais obesos em relação aos controles, Sham ou VgX (Figura 35 D, F).

Já no tecido adiposo subcutâneo, percebemos que houve aumento no número absoluto de células T CD4⁺ somente em animais Sham submetidos à dieta hiperlipídica, mas não nos vagotomizados submetidos à mesma dieta (Figura 36 B). Nas ILCs, houve redução das citocinas IL-13 e IL-5 nos grupos HFD em relação ao controle, mas não houve diferença significativa entre os grupos Sham e VgX na dieta hiperlipídica (Figura 36 C, E). Houve redução global de células T CD4⁺ produtoras destas citocinas no tecido de animais obesos, Sham ou VgX (Figura 36 D, F). Estas alterações eram esperadas, considerando os resultados observados na caracterização fenotípica do mesentério e tecido adiposo subcutâneo após bloqueio da via colinérgica. Elas também podem explicar, em partes, o fenótipo de mudança metabólica destes animais na falha de sinalização pela acetilcolina neste tecido.

Resultados

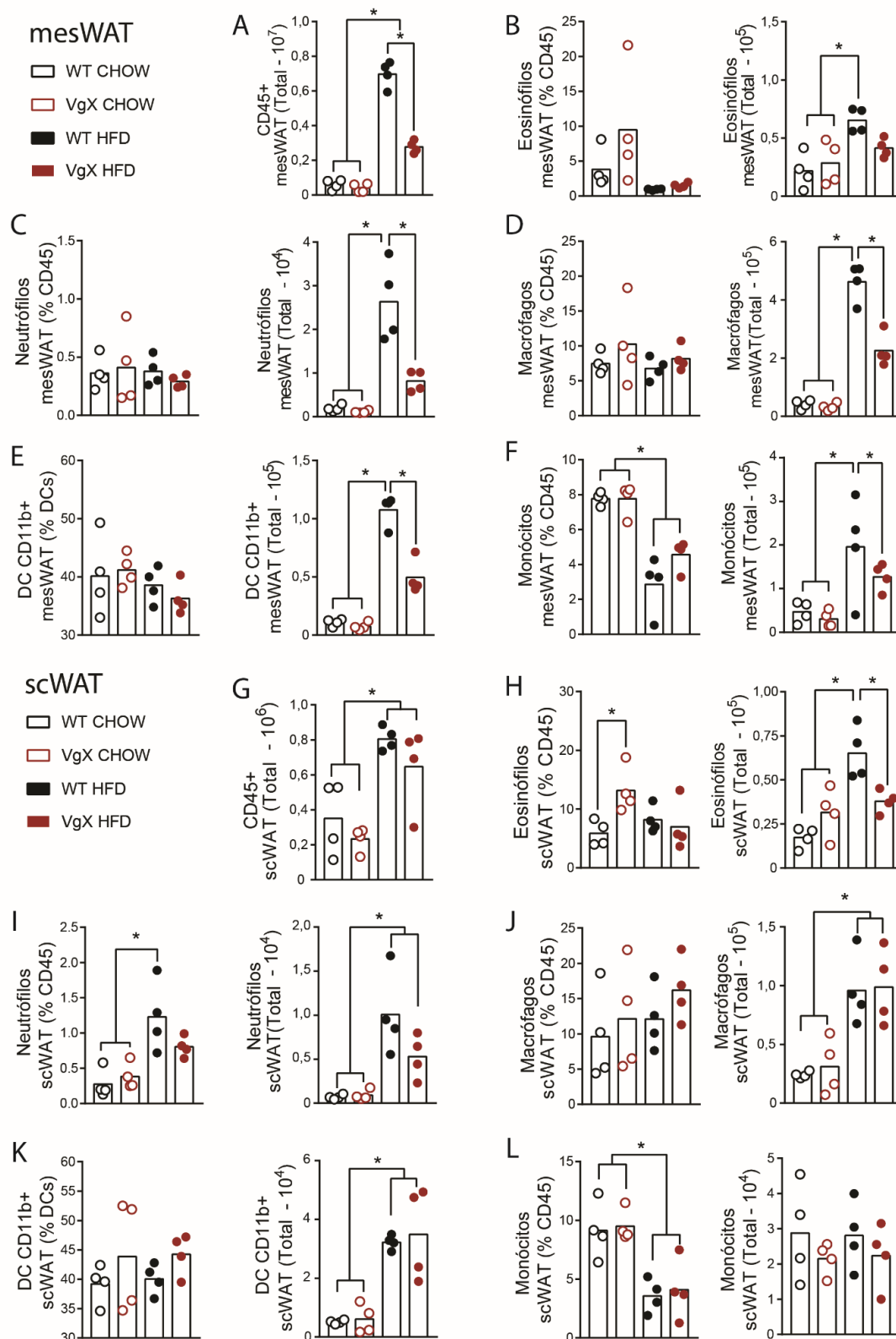


Figura 34 – Caracterização das populações celulares mieloides presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VgX submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) caracterização das células CD45 totais e mieloides presentes nos tecidos adiposos mesentérico (mesWAT) e (G-L) subcutâneo (scWAT) de animais VgX e Sham, submetidos à dieta hiperlipídica. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos de barra representam a média. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

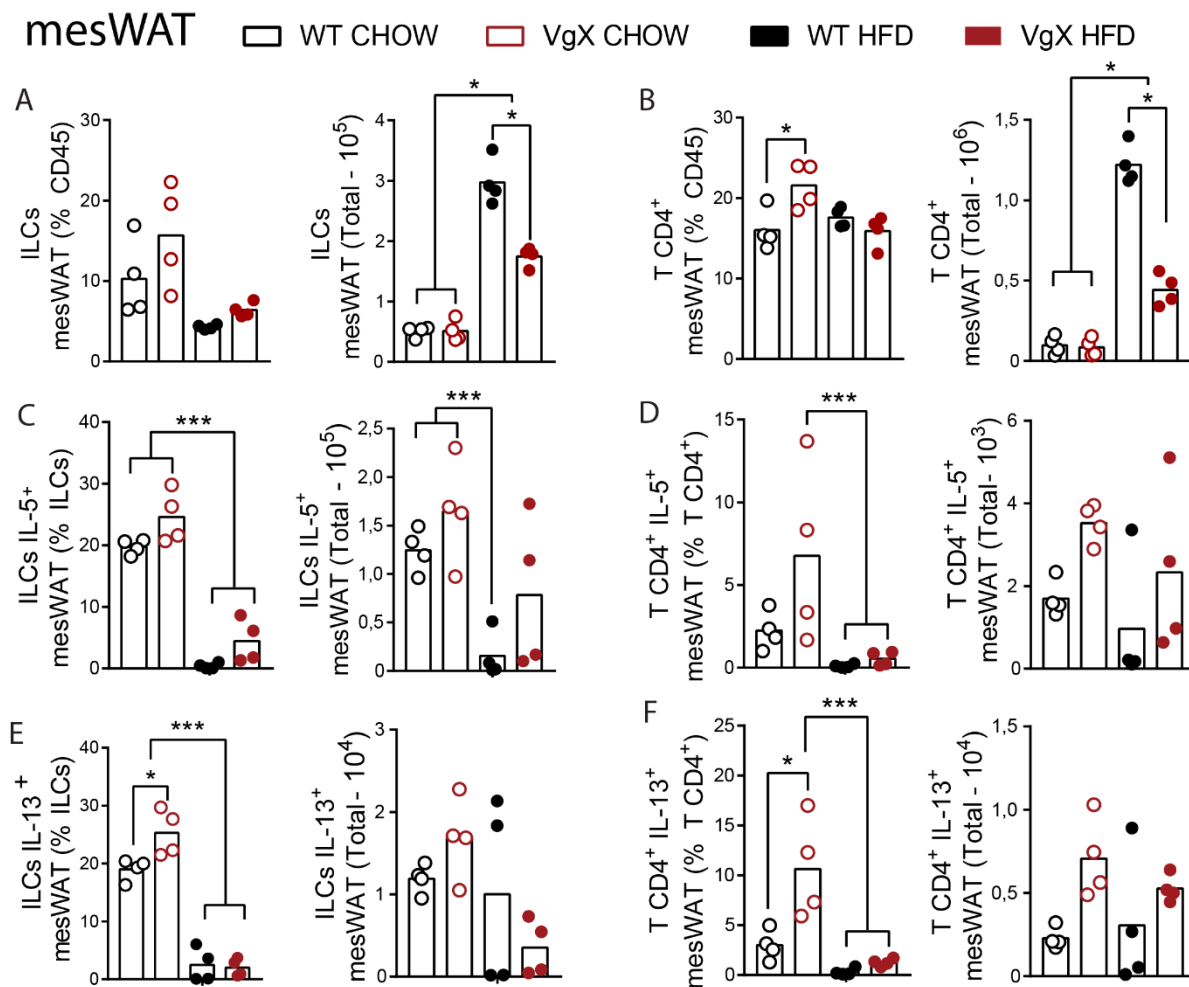


Figura 35 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do mesWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) Perfil de produção de citocinas pelas células T e ILCs no tecido adiposo mesentérico (mesWAT) de animais Sham ou VgX sob dieta controle ou hiperlipídica. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IL-5 e IL-13. O tecido foi analisado de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Resultados

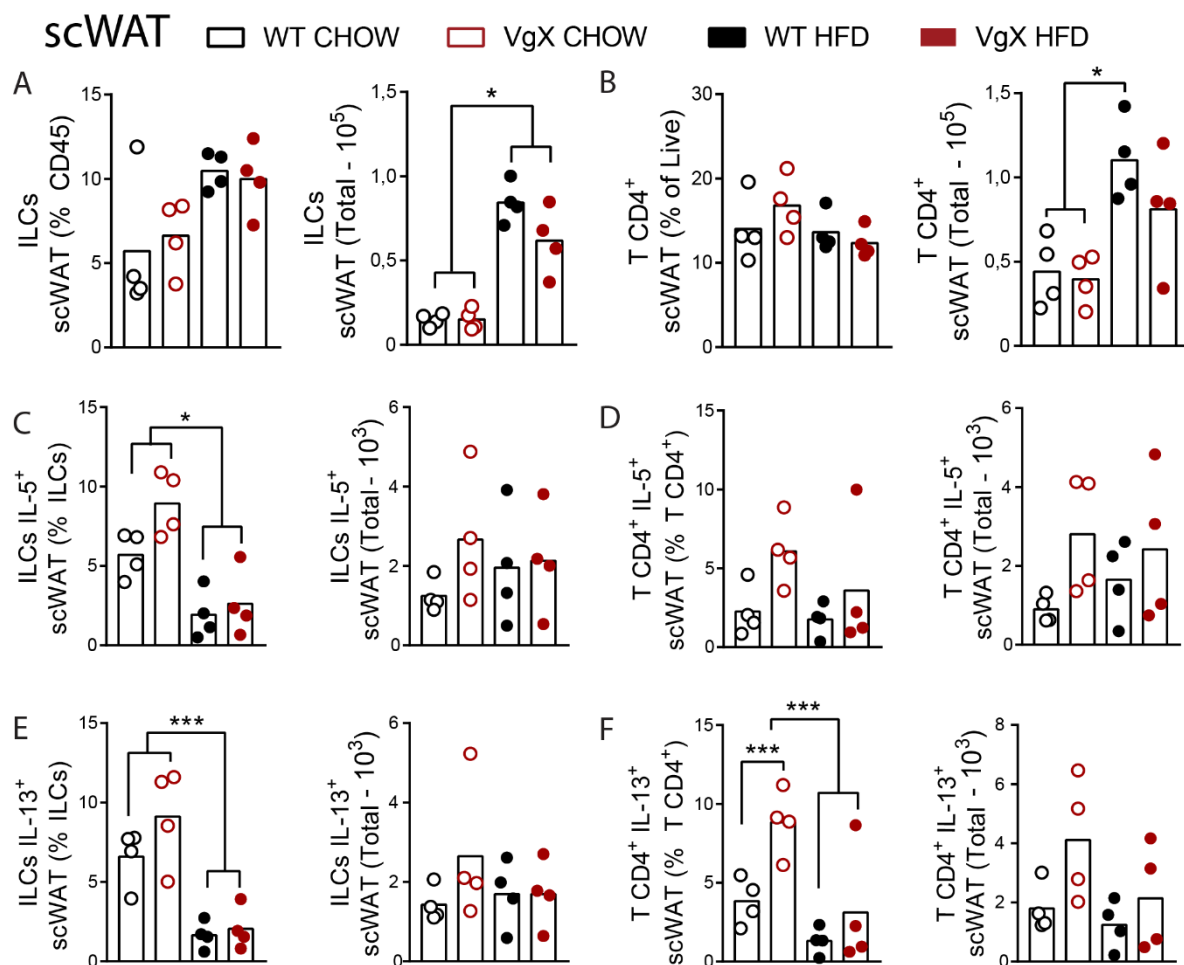


Figura 36 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do scWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica.

(A-F) Perfil de produção de citocinas pelas células T e ILCs no tecido adiposo subcutâneo (scWAT) de animais Sham ou VgX sob dieta controle ou hiperlipídica. Dentro destas populações, quantificou-se a produção de IL-5 e IL-13. O tecido foi analisado de acordo com a estratégia de gates descrita na Figura 3. Os gráficos de barra representam a média. Resultados representativos de um experimento. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.8 – Perfil metabólico das células do sistema imune no tecido adiposo de animais após inibição da via colinérgica

Decidimos também avaliar se as mudanças no perfil metabólico do tecido, causadas pela inibição da via colinérgica, poderiam implicar na mudança de perfil celular das células do sistema imune residentes. Para isso, realizamos um ensaio de captação de glicose/lipídios *in vivo* nestes animais. As células foram analisadas por citometria de fluxo após injeção de 2-NBDG ou Bodipy nos animais, por intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas nas diferentes populações celulares. Uma alta captação de 2-NBDG poderia significar que as células estavam com perfil mais glicolítico no momento da análise, e maior captação de Bodipy poderia indicar um perfil oxidativo predominante. Em relação à captação de 2-NBDG, observamos que, no mesWAT, houve diferença significativa somente na população de células mieloides CD11b positivas (Figura 37 A). Células CD11b⁺ de animais VACht KD captaram menos glicose que as células de animais WT. Quanto ao scWAT, houve diferença de captação nas células CD11b⁺, ILCs, ILC2, T CD4, T CD8, e nos eosinófilos (Figura 37 B). Todas estas populações captaram menos glicose nos animais VACht KD, em relação aos animais WT.

Também avaliamos a captação de lipídios pela marcação com Bodipy. O Bodipy é uma molécula hidrofóbica capaz de se ligar a partículas lipídicas no interior das células. Em relação ao mesWAT, percebemos que houve redução na captação da molécula pelas células CD11b⁺, ILCs totais e ILC2 de animais VACht KD, em relação às mesmas populações em animais WT (Figura 38 A). No scWAT, diferença significativa foi observada somente em relação à captação de Bodipy pelos eosinófilos presentes no tecido de animais VACht KD em relação aos animais WT; houve redução na captação da molécula (Figura 38 B). Estes resultados, apesar de apontarem diferenças significativas em relação à atividade metabólica entre as células nestes tecidos nos animais VACht KD, não nos permitem inferir com clareza se as células primam por um metabolismo mais glicolítico ou oxidativo nas condições experimentais estabelecidas.

Resultados

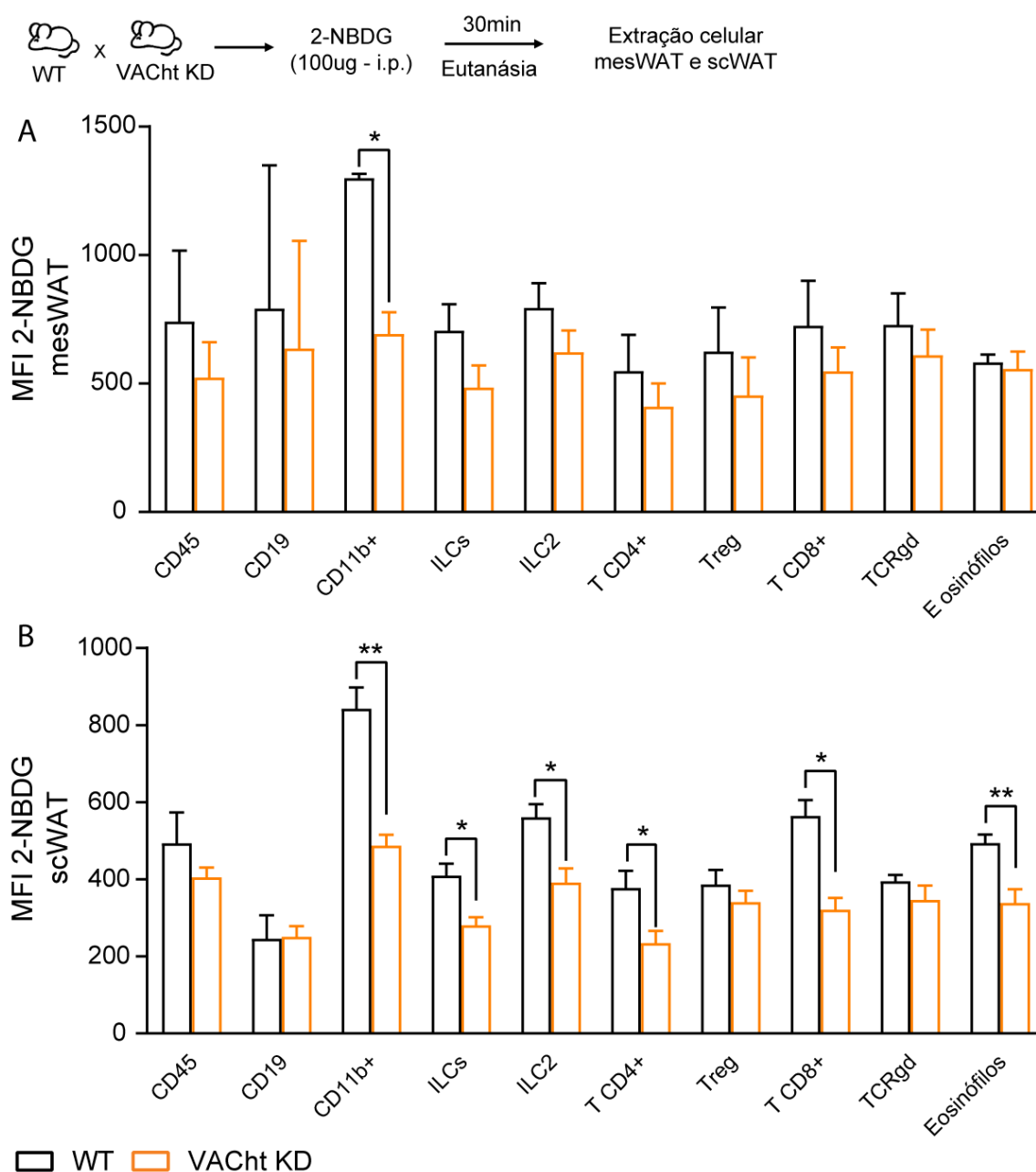


Figura 37 – Captação de 2-NBDG pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD.

(A) Captação intracelular de glicose pelas células do tecido adiposo mesentérico (mesWAT) ou (B) do tecido adiposo subcutâneo (scWAT) de animais WT ou VACht KD. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal com 100ug de 2-NBDG, 30min a priori do momento da eutanásia. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos foram representados com o erro padrão da média. Os gráficos de barra representam a média. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Resultados

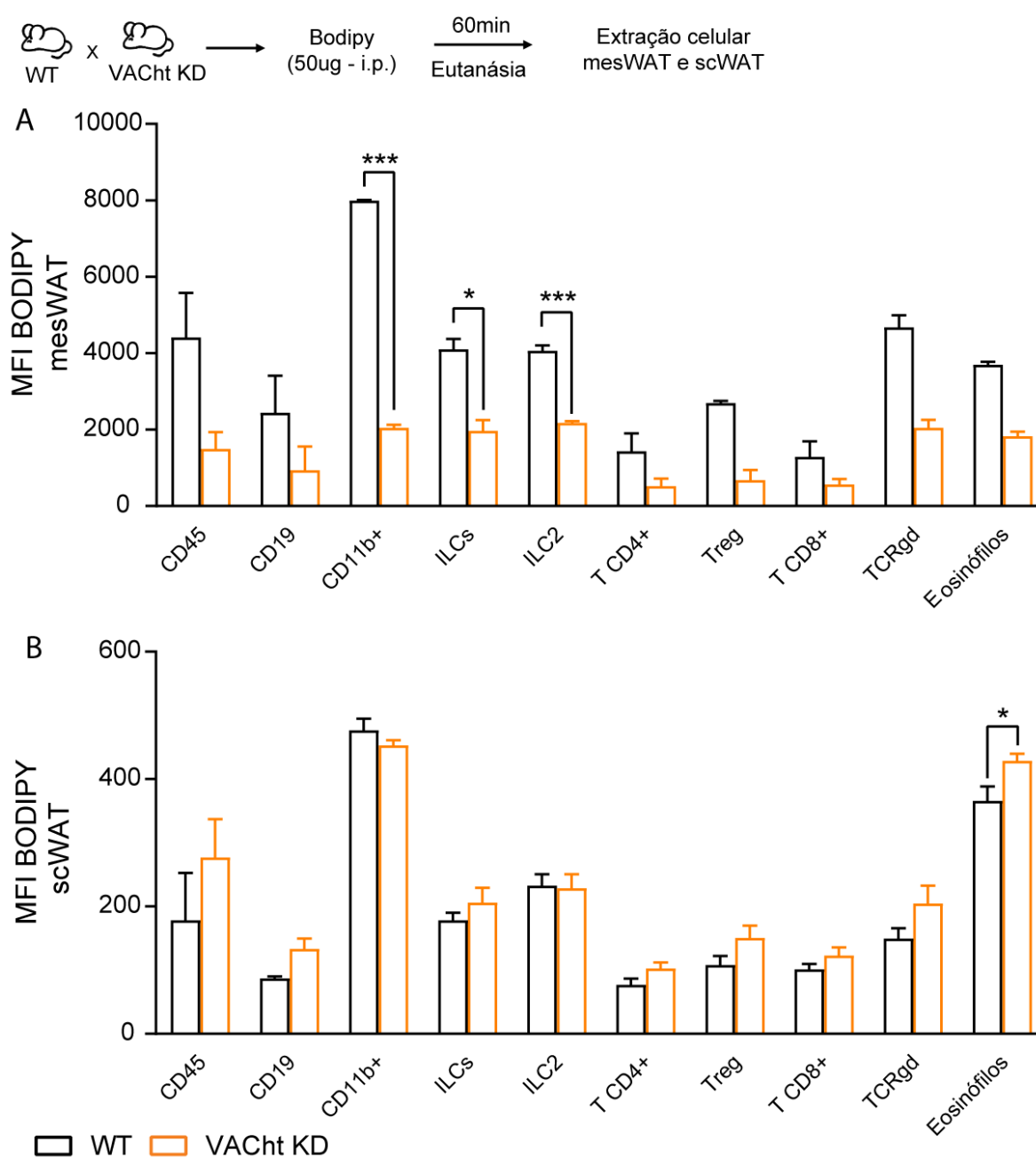


Figura 38 – Captação de Bodipy pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD.

(A) Captação intracelular de Bodipy pelas células do tecido adiposo mesentérico (mesWAT) ou (B) do tecido adiposo subcutâneo (scWAT) de animais WT ou VACht KD. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal com 50ug de Bodipy, 60min a priori do momento da eutanásia. Resultados representativos de um experimento. Os gráficos foram representados com o erro padrão da média. Os gráficos de barra representam a média. *P<0,05; **P< 0,01; *** P<0,001.

Resultados

4.9 – Avaliação da inervação colinérgica e produção celular de acetilcolina no tecido adiposo

Após avaliar o fenótipo metabólico e celular do tecido adiposo nos animais, analisamos se os efeitos encontrados estariam sendo mediados por inervação colinérgica direta tecidual, e se isso teria relação com o fenótipo mais evidente no tecido adiposo visceral (mesWAT). Para saber se os efeitos observados poderiam ser ocasionados por inervação direta nos tecidos, utilizamos animais *reporter* para colina acetiltransferase (ChAT, do inglês *choline acetyltransferase*), enzima relacionada à via de produção da ACh. Anticorpos anti-ChAT usualmente são ineficazes na correta detecção da expressão de ChAT por neurônios periféricos ou células não neuronais. Estes animais, ChAT *Cre-TdTomato*, apresentam fluorescência em todas as células produtoras de acetilcolina, sejam neurônios ou células de origem não neuronal. Dessa forma, coletamos diferentes depósitos de tecido adiposo destes animais e fizemos também a marcação para a molécula CD45, a fim de avaliar as zonas de sobreposição para leucócitos. Os tecidos foram analisados por microscopia confocal.

Avaliamos a presença de fibras colinérgicas no mesWAT (Figura 39 A), omento - omWAT (Figura 39 B), tecido adiposo perigonadal – pgWAT (Figura 39 C), scWAT (Figura 40 A), BAT (Figura 40 B), e intestino grosso (Figura 40 C). O intestino grosso foi utilizado como um controle positivo, sabendo que o plexo mioentérico é uma região periférica amplamente inervada por fibras colinérgicas. O que conseguimos diferenciar nitidamente é que, nos tecidos adiposos viscerais (mesWAT, omWAT e pgWAT), encontramos intensa inervação colinérgica, que pôde ser evidenciada pelas fibras nervosas presentes no tecido adiposo mesentérico. De maneira curiosa, estas fibras conseguem alcançar diretamente os pontos de concentração das células da resposta imune no tecido, os FALCs (Figura 39). Outro fato interessante foi a densa expressão de ChAT pelas células do sistema imunológico nos três tecidos. É sabido que as células do sistema imunológico, principalmente os linfócitos, são capazes de produzir ACh (FUJII et al., 2017b). Este fenótipo pode ser visto nas células residentes do tecido adiposo.

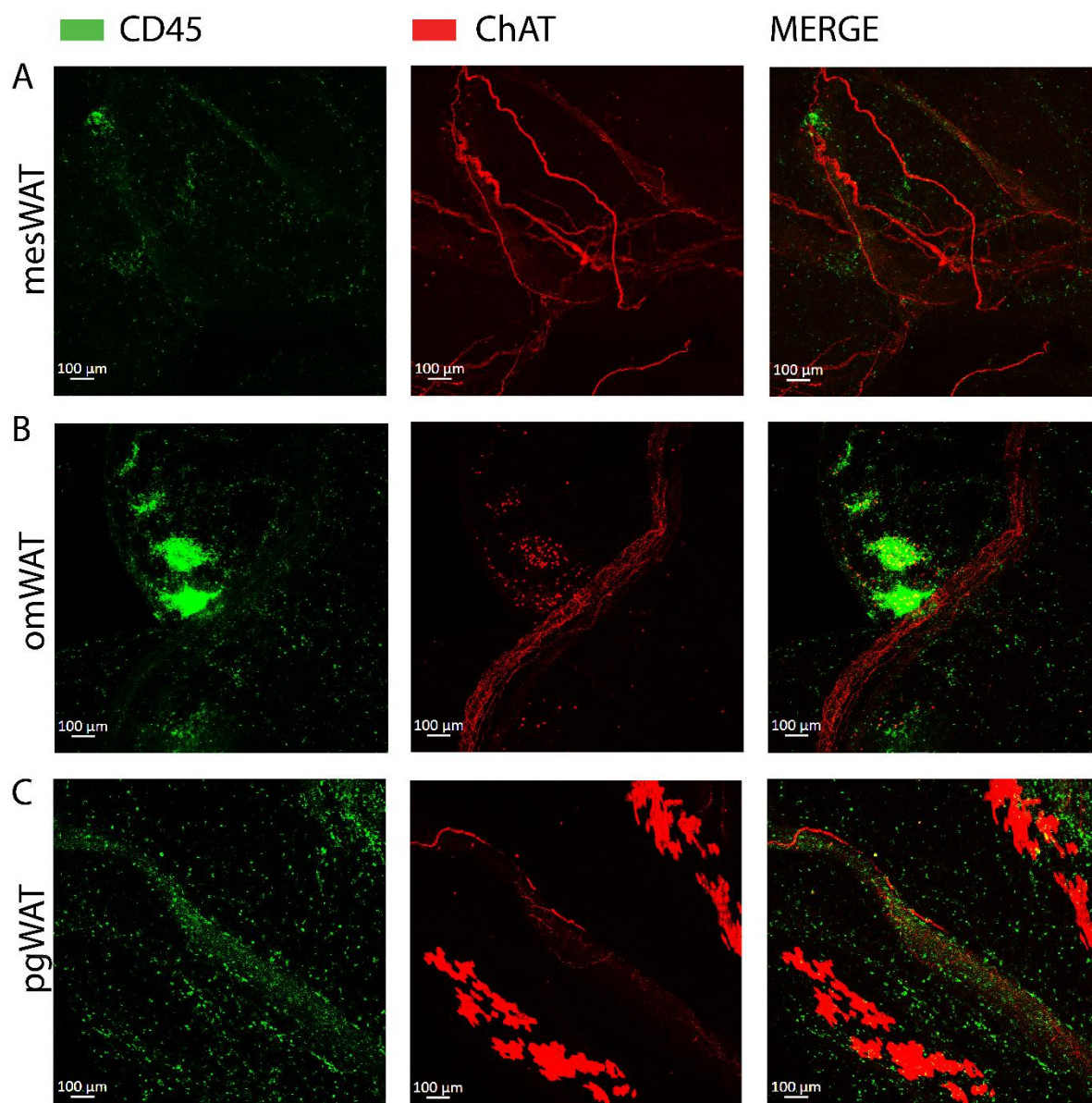


Figura 39 – Análise da inervação colinérgica em diferentes tecidos adiposos viscerais.

(A) Tecido adiposo mesentérico (mesWAT); (B) tecido adiposo omental (omWAT); (C) tecido adiposo perigonadal (pgWAT). As fibras foram visualizadas através da utilização de animais ChAT reporter, que possuem uma proteína RFP recombinante na região de expressão da enzima colina acetiltransferase. Resultados representativos de um experimento.

Resultados

Nos tecidos adiposos parietais como scWAT e BAT, a densidade de fibras colinérgicas é muito menor comparada aos demais tecidos observados (Figura 40 A e B). Pudemos ver que, apesar da presença de células produtoras de ACh nestes tecidos, evidenciado pela marcação de ChAT sobrepondo às regiões CD45+, não há a passagem de fibras colinérgicas pelos tecidos, de forma oposta ao observado nos tecidos adiposos viscerais. Essa ausência foi confirmada pela observação da diferença com o intestino (Figura 40 C), que possui densidade elevada de fibras colinérgicas. Os resultados apresentados podem ser relacionados com a passagem de fibras parassimpáticas nas regiões viscerais, e não parietais, o que justificaria a diferença entre os tecidos estudados.

Após analisar a presença das fibras, fomos avaliar esta expressão da enzima ChAT nas células do sistema imune presentes nos diversos tecidos. Em relação ao tecido adiposo mesentérico, percebemos que a localização das células produtoras de ACh sobrepunha a região das FALCs, que são as principais regiões de aglomeração de células linfoides no tecido. Isso foi corroborado pela marcação de CD90.2, indicador de células linfoides (Figura 41 A). Fizemos também a citometria de fluxo dos tecidos para avaliação das células produtoras de ACh. Em relação ao total de células produtoras de ACh no mesWAT, observamos que cerca de 5% das células vivas CD45+ do tecido são responsáveis pela produção (Figura 41 B). Avaliando as populações celulares específicas, percebemos que, conforme observado por imunofluorescência, a maior porcentagem de células produtoras de ACh no mesWAT foram as células linfoides. Estas células correspondem tanto às CD90.2 positivas (Thy1.2), sendo ILCs e células T, quanto aos linfócitos B (Figura 41 C). Porém, ao acessar a expressão da molécula dentre as mesmas populações por intensidade média de fluorescência, percebemos que a população que expressa maior densidade de ChAT são as ILCs, em maior nível que células T ou B (Figura 41 D).

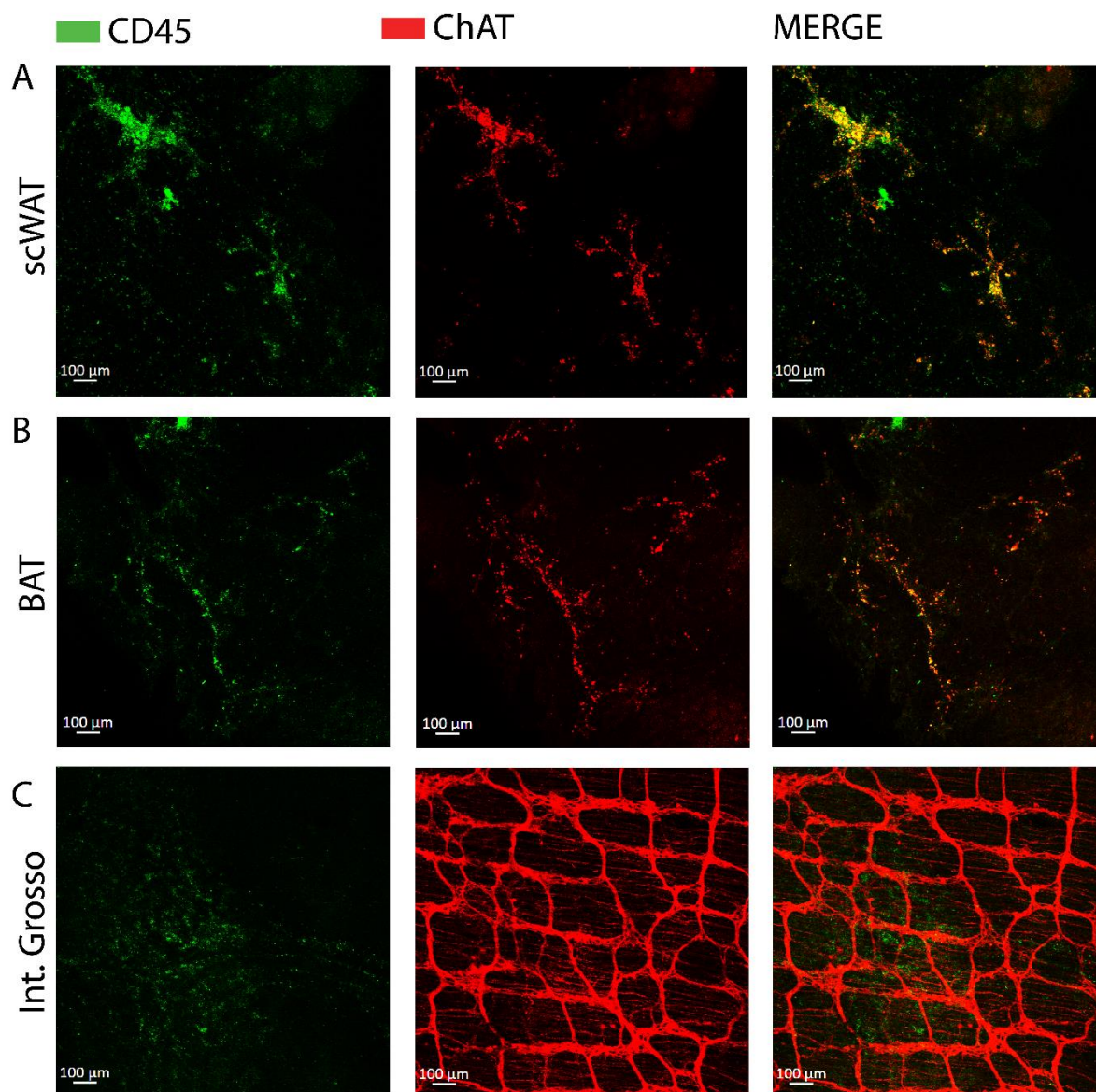


Figura 40 – Análise da inervação colinérgica em tecidos adiposos parietais e no intestino.

(A) Tecido adiposo subcutâneo; (B) tecido adiposo omental; (C) tecido adiposo perigonadal. As fibras foram visualizadas através da utilização de animais ChAT reporter, que possuem uma proteína RFP recombinante na região de expressão da enzima colina acetiltransferase. Resultados representativos de um experimento.

Resultados

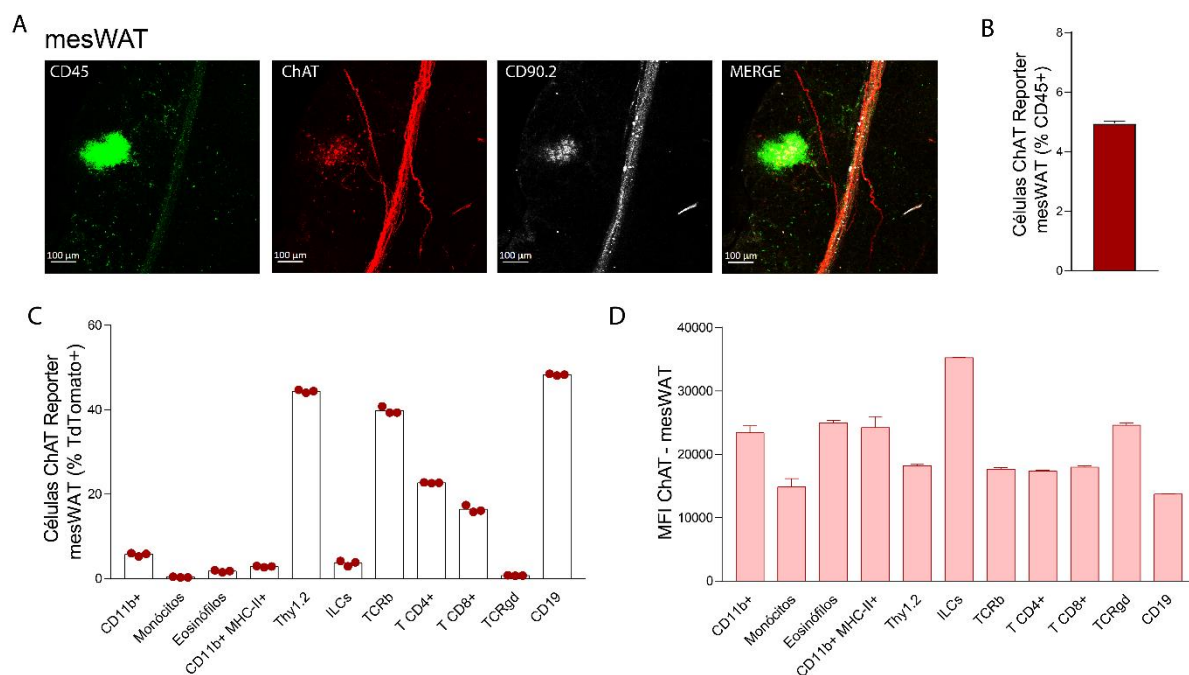


Figura 41 – Análise da expressão de ChAT pelas células do sistema imune presentes no mesWAT.

(A) Imunofluorescência de tecido adiposo mesentérico (mesWAT) de animais ChAT reporter, mostrando a densidade de fibras no tecido, a comunicação com as regiões de FALCs, e a presença de células ChAT⁺; (B) proporção de células ChAT⁺ dentro do total de CD45⁺ vivas; (C) diferenças na expressão de ChAT⁺ em diferentes populações celulares do mesWAT e (D) intensidade de expressão da enzima ChAT. Para este experimento foram utilizados animais ChAT reporter, que possuem uma proteína RFP recombinante na região de expressão da enzima colina acetiltransferase. Resultados representativos de um experimento.

Avaliamos também a produção de ChAT pelas células de outros tecidos adiposos, baço e intestino grosso (Figura 42). Percebemos que a proporção do total de células produtoras de ACh é bastante similar em todos os tecidos (em torno de 5%) (Figura 42 A). No entanto, a proporção entre as populações responsáveis por esta produção se altera de acordo com o respectivo tecido. O intestino apresentou um perfil muito similar ao mesentérico, com as células linfoides sendo responsáveis pela produção da maior parte de ACh não neuronal presente no tecido, especialmente as ILCs (Figura 42 B, C). Já o pgWAT e o scWAT apresentaram uma peculiaridade em comparação ao mesWAT, com uma alta taxa de células mieloides CD11b⁺ expressando ChAT (Figura 42 D – G). O baço, de maneira interessante, apresentou grande expressão de ChAT pelas células B (Figura 42 H, I). Dessa forma, podemos inferir que a produção de ACh pelas células do sistema imune é tecido dependente, e varia de acordo com cada um deles.

Resultados

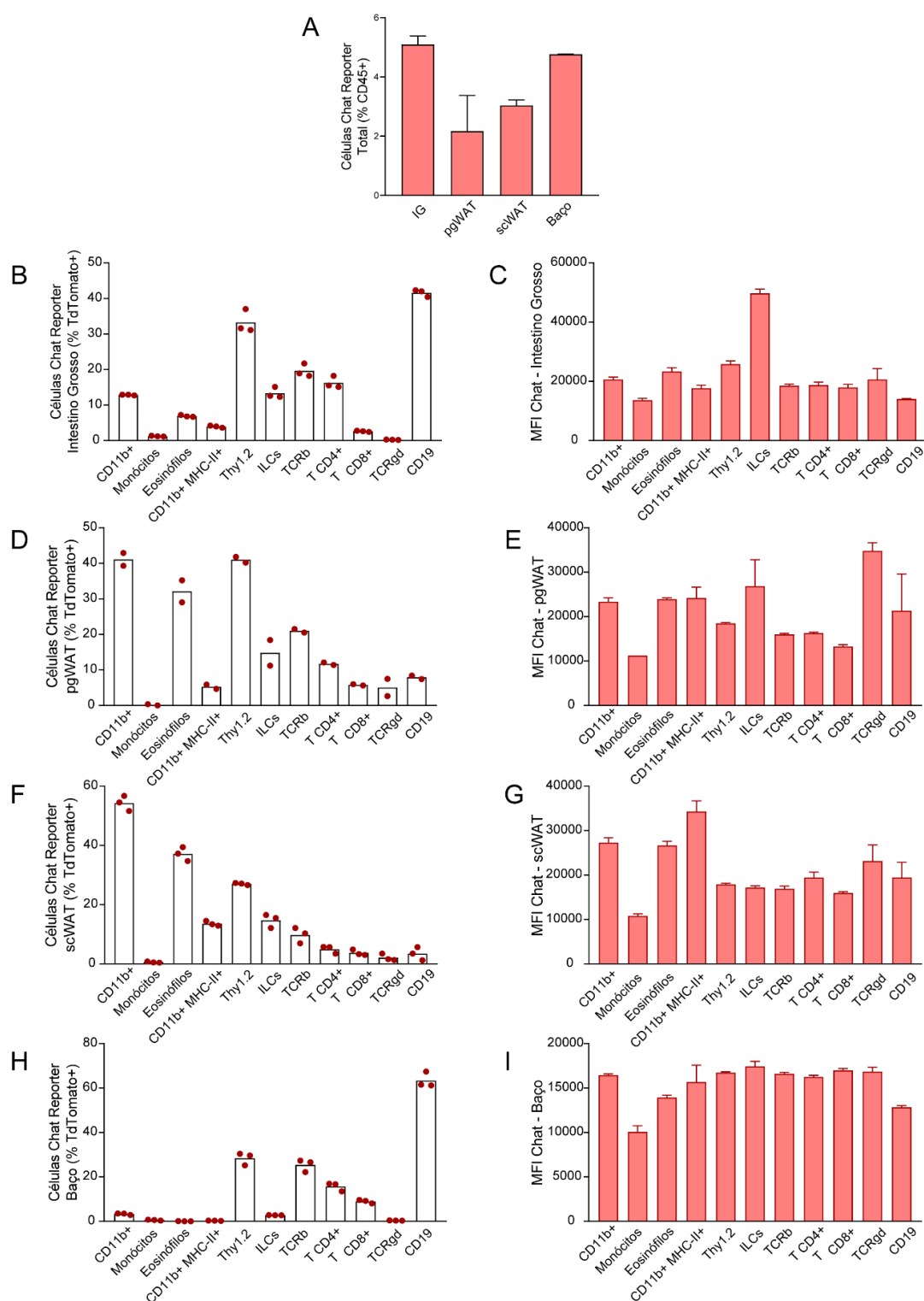


Figura 42 – Análise da expressão de ChAT pelas células do sistema imune presentes no intestino, pgWAT, scWAT e baço de animais reporter.

(A) Proporção de células produtoras de ACh dentro do total de CD45+ vivas. Foram caracterizadas as células do (B, C) intestino grosso (IG); (D, E) tecido adiposo perigonadal; (F, G) tecido adiposo subcutâneo; e (H, I) baço. Para estes experimentos, foram utilizados animais ChAT reporter, que possuem uma proteína RFP recombinante na região de expressão da enzima colina acetiltransferase. Resultados representativos de um experimento.

5. Discussão

A caracterização fenotípica dos leucócitos presentes no mesWAT de animais WT e de animais VACht KD mostra algo intrigante em relação ao impacto da sinalização colinérgica na homeostase imunológica deste tecido. Nossa hipótese inicial era de que, na falha de um mecanismo regulatório como a via colinérgica, haveria a polarização dos perfis celulares nestes tecidos para um perfil de inflamação Th1, tanto nas células do sistema imune inato (como a polarização de macrófagos para o perfil M1 e recrutamento de neutrófilos), quanto nas células do sistema imune adaptativo, predominando um perfil Th1 de resposta celular. Porém, pudemos observar aumento em todos os perfis de resposta após bloqueio da via, com ênfase especial às células do perfil Th2. Além do aumento da expressão de GATA-3 nas células T, pudemos observar um aumento considerável nas ILC2 e eosinofilia evidenciada (Figuras 5-10).

Sabemos que estas populações já estão presentes em grandes quantidades no mesWAT em condições homeostáticas (OSBORN; OLEFSKY, 2012). Entretanto, na deficiência da via, apesar da redução no número total de leucócitos, há um aumento expressivo nas populações efetoras no mesWAT destes animais, significativamente em relação aos animais controle. Da mesma maneira, a inibição farmacológica da via promoveu aumento nas mesmas populações neste tecido, corroborando com o modelo. Houve aumento de eosinófilos, acompanhado de aumento nas populações de Th1 e Th2, além de mudança expressiva na população de ILCs causado por aumento nas ILCs do tipo 2 (que expressam GATA-3) no mesWAT (Figuras 11-16). Fenótipo muito similar foi observado nos animais submetidos à vagotomia unilateral (Figura 17-21). Apesar disso, a intensidade da alteração nas populações celulares neste modelo foi menos intensa que nos outros dois. Acreditamos que isso possa ter acontecido por alças de feedback positivo que possam ter se evidenciado após cirurgia e ablação repentina da via colinérgica, atenuando o fenótipo.

Além das alterações observadas entre as populações, ainda não entendemos por que há diminuição no número total de células no tecido adiposo visceral destes animais após bloqueio da via. Hipotetizamos que estas células possam estar

Discussão

morrendo por excesso de ativação, ou migrando para outros tecidos, como o intestino. Porém, não conseguimos ver aumento destas mesmas populações celulares no intestino delgado, por exemplo. Outro ponto interessante é o fato de que as alterações observadas no mesWAT após ablação da via colinérgica não foram vistas com a mesma intensidade no scWAT, mLN ou baço. Isso nos faz pensar na relação da inervação colinérgica via sistema nervoso parassimpático com estes tecidos. Considerando que o mesWAT é um tecido adiposo visceral, e que possui relação estreita com a inervação vagal, principal via sinalizadora colinérgica, faz sentido pensar que os efeitos da ablação do SNA parassimpático seriam mais pronunciados neste tipo de tecido adiposo e outros órgãos viscerais. Em comparação, nem o scWAT, nem o baço, que não são inervados diretamente por fibras parassimpáticas, apresentaram diferenças expressivas quando houve ablação na sinalização por esta via (Figuras 39, 40 e 41). Apesar disso, pudemos perceber que houve aumento das populações como ILC2, eosinófilos e produção de citocinas do perfil de resposta 2 no tecido adiposo subcutâneo de animais vagotomizados. Isso pode indicar alguma mudança sistêmica na produção de um metabólito que ocorre após ablação do nervo vago. Porém, não é possível concluir o motivo da ocorrência deste fenômeno.

Já foi descrito que a ação da ACh sobre macrófagos em cultura estimulados por LPS foi capaz de atenuar a produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-18. Os seus efeitos também foram descritos na diminuição de fatores pró-inflamatórios pelo fígado (BOROVIKOVA et al., 2000; QIU; YUPING; JIANHE, 1996; TRACEY, 2005). Porém, pouco é conhecido sobre seu papel na regulação de células do perfil Th2, especialmente no tecido adiposo. Já existem alguns trabalhos relacionando a ativação da via colinérgica na inibição de doenças pulmonares, como a asma, que sabidamente são caracterizadas por exacerbação deste tipo de resposta. Utilizando um agonista específico do receptor nAChR $\alpha 7$, PINHEIRO et al perceberam que o estímulo com acetilcolina em receptores nicotínicos predominantes em leucócitos reduziu drasticamente o score da doença inflamatória pulmonar. O estímulo da via colinérgica reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido e a produção de citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IL-6. O tratamento com o agonista específico também diminuiu a fosforilação de NF- κ B, além de reduzir a deposição de colágeno. Além disso, foi capaz de reduzir a frequência de macrófagos do perfil M1, e aumentou a expressão de moléculas relacionadas ao perfil M2, como CD206 e produção de IL-10. Em animais

desafiados com infusão de LPS nas vias aéreas, o agonista colinérgico bloqueou a inflamação e recuperou a função pulmonar dos animais (PINHEIRO et al., 2015, 2017).

Outro ponto importante a ser considerado é o efeito da ACh sobre o metabolismo energético dos animais. Percebemos que, em ambos os modelos, de animais transgênicos ou inibição farmacológica, os animais apresentaram melhor resposta metabólica (Figuras 26-34). Nos animais transgênicos ou vagotomizados, pudemos ver diminuição no ganho de peso, menor resistência à insulina nos obesos, maior clearance de glicose, metabolismo aeróbico melhorado, além de menor acúmulo lipídico nos tecidos como fígado e menos branqueamento do tecido adiposo marrom. Nos animais tratados com a mecamilamina, os efeitos foram menos pronunciados, mas ainda assim indicam que a ausência da via é capaz de causar melhorias metabólicas nestes animais submetidos à dieta hiperlipídica. Isso pode ter ocorrido devido ao período de início do tratamento que ocorreu após 11 semanas do início de administração da dieta hiperlipídica. Apesar disso, conforme observado nos outros dois grupos experimentais, percebemos que a redução de sinalização pela via é sim capaz de causar alterações no perfil metabólico do animal. No entanto, devemos também levar em consideração que estes efeitos podem ser epifenômenos, causados por ação do sistema nervoso autônomo em outras vias do sistema nervoso ou vias metabólicas, o que pode ocasionar os fenótipos vistos. Hipotetizamos que esse efeito pudesse ocorrer, talvez, por atividade alterada do sistema nervoso simpático nestes animais com o bloqueio da sinalização colinérgica. No entanto, a dosagem de NA/Adr no plasma destes grupos foi inconclusiva. Dessa forma, imaginamos que todos estes efeitos possam ser decorrentes da sinalização via sistema nervoso parassimpático. Porém, o mecanismo pelo qual isso ocorre não está elucidado.

Há trabalhos relacionando a ausência de receptores muscarínicos do tipo 3 (M3) e benefícios metabólicos para o animal, como ganho de peso reduzido na HFD, melhora na resposta à insulina e clearance de glicose no sangue, e maior gasto energético basal (GAUTAM et al., 2006). Há outros trabalhos também demonstrando que um antagonista muscarínico (Mirabegron) auxiliam na liberação de um ácido graxo da família do ômega-3, que ajuda a promover *uptake* de glicose e faz a manutenção do tecido adiposo marrom (LEIRIA et al., 2019). Por outro lado, outros trabalhos relacionam o papel da sinalização aumentada de ACh com hiperinsulinemia

em animais obesos e hiper-reatividade de vias aéreas, por sinalização via ERK, relacionando estes animais a quadros asmáticos (LEIRIA et al., 2015; LEIRIA; MARTINS; SAAD, 2015). Já foi visto, inclusive, que a vagotomia cervical unilateral em indivíduos obesos ajuda a combater a obesidade mórbida (KRAL, 1979, 1983). O mesmo foi visto em ratos (BALBO et al., 2016). Isso corrobora com nossos dados de inibição da liberação de ACh ou bloqueio dos receptores nicotínicos, no metabolismo dos animais VACht KD e vagotomizados.

Outra questão importante são as diferentes formas de interação entre a inervação colinérgica com os diferentes depósitos de tecido adiposo. Apesar de sabermos que a maioria das células presentes neste tecido expressam receptores colinérgicos e adrenérgicos (LIU; MIZUTA; MATSUKURA, 2004), os trabalhos presentes na literatura evidenciam, em sua grande parte, o papel da inervação simpática para o controle do tecido (GUILHERME et al., 2019). Até então, pouco ainda era sabido sobre como era a interação da inervação parassimpática com as células imunes presentes no tecido adiposo visceral. Já era conhecido que as fibras parassimpáticas, aferentes do nervo vago, passam pelo mesWAT para alcançar o intestino e ali exercer funções de regulação autonômica da contratilidade e produção de muco intestinal (COFFEY; WALSH, 2020). Em nossos resultados, conseguimos visualizar a comunicação entre as fibras parassimpáticas com os focos de células do sistema imunológico presentes no tecido adiposo, as FALCs (Figura 41). Essas regiões apresentam grande densidade de células linfoides, tanto linfócitos T e B, quanto células linfoides inatas. Isso pode explicar parcialmente o porquê deste fenótipo ser muito intenso nas ILCs e células T. Conseqüentemente, a alteração do perfil celular e produção de citocinas por estas células culminaria com o recrutamento de outras células para o tecido, como eosinófilos.

No caso destas mudanças observadas no tecido adiposo do animal quando há desbalanço de sinalização da via colinérgica serem ocasionadas por inervação direta do tecido, podemos imaginar duas situações distintas: pela ação direta da ACh sobre as células imunes presentes no tecido adiposo, ou ação da ACh sobre os adipócitos e fibroblastos do tecido, que também possuem receptores para este neurotransmissor (LIU; MIZUTA; MATSUKURA, 2004). Na possibilidade da ação da ACh ocorrer diretamente sobre as células do sistema imune, as células, na ausência da acetilcolina, podem estar se mobilizando para o tecido adiposo devido a uma maior

ativação da via de NF- κ B, o que leva a uma maior produção de citocinas inatas principalmente pelos macrófagos residentes, e recrutamento celular de linfócitos e leucócitos em geral. Porém, a acetilcolina pode exercer efeito direto sobre os adipócitos ou fibroblastos do estroma. Neste caso, a ausência da acetilcolina sugere um desbalanço nas atividades celulares, que pode promover maior produção de fatores quimiotáticos e posterior regulação do sistema imune. Esse efeito poderia ocorrer pela produção de uma citocina ou de algum metabólito produzido durante as atividades catabólicas destas células. No entanto, isso não ficou esclarecido em nossas análises.

Trabalhos recentes têm associado a produção de citocinas pelas células residentes do tecido adiposo, como os fibroblastos precursores de adipócitos, para controle do tônus eosinofílico e da resposta Th2 neste tecido. Na maioria das vezes, essa resposta é associada à atividade da citocina IL-33 (JACKSON-JONES et al., 2020; MAHLAKÖIV et al., 2019; YANG et al., 2013). Além disso, trabalhos recentes têm demonstrado que as vias neuroimunes podem interferir diretamente na atuação dessa citocina e atuar no desenvolvimento de distúrbios metabólicos (DING et al., 2016; MORIYAMA et al., 2018). Um trabalho demonstrou que a mucosa intestinal de camundongos tratados com IL-33 apresenta resposta alterada ao estímulo colinérgico, com diferença na contratilidade e absorção de glicose (YANG et al., 2013). Estas alterações estavam relacionadas com a sinalização de vias inatas de transcrição, uma vez que camundongos MyD88 KO não apresentavam esse fenótipo. Outro trabalho demonstrou que as ILCs do tipo 2, que expressam altas quantidades de receptores α 7nAChR colinérgicos, tem esse receptor regulado positivamente na presença de IL-33 (GALLE-TREGER et al., 2016). A utilização de um agonista α 7nAChR consegue suprimir as vias de sinalização de GATA-3 e de NF- κ B em ILC2s, o que resulta na diminuição da produção de citocinas tipo 2 em camundongos e humanos (KABATA; MORO; KOYASU, 2018). Esses dados, associados a nossos resultados, levam a crer que a sinalização via IL-33 possa estar intrinsecamente relacionada a estes fenótipos observados. Porém, a participação desta citocina neste fenótipo ainda não foi abordada por nosso grupo de pesquisa.

Os resultados também demonstram que as mudanças observadas no tecido de animais magros após bloqueio da via colinérgica também se evidenciam quando os animais são submetidos à dieta hiperlipídica (Figuras 31-36). Percebemos que,

principalmente no mesWAT, similar ao perfil já visto no tecido de animais magros, há diminuição no total do infiltrado inflamatório dos animais submetidos à cirurgia de vagotomia unilateral após administração da dieta HFD. Isso pode ser observado em ambos os modelos, de animais VACht KD ou vagotomizados. Há redução do infiltrado inflamatório CD45+ total nestes tecidos, que se reflete em todas as populações celulares, de forma mais evidente no tecido adiposo visceral (mesWAT). Porém, tal fenótipo também pôde ser visto no tecido adiposo subcutâneo, em ambos os modelos experimentais. Além disso, um fenômeno interessante foi a diferença da produção de citocinas pelas células linfoides inatas e células T nestes animais. Ambas as populações parecem ser mais capazes de produzir citocinas como IL-5 e IL-13 nos animais com redução da via colinérgica. A produção destas citocinas pelas células do tecido adiposo geralmente é relacionada a um melhor perfil metabólico deste tecido. Segundo KOREN et al., 2011; TREMAROLI, 2012, alterações nas células do sistema imunológico são importantes no processo de desencadeamento dos transtornos metabólicos, e podem estar relacionadas a processos como o desenvolvimento da obesidade. Considerando a atuação do sistema colinérgico sobre estas células (JOHNSTON; WEBSTER, 2009; TRACEY, 2002), o que também foi evidenciado em nossos resultados, estes efeitos metabólicos observados podem ser também oriundos da mudança nos leucócitos do tecido adiposo após bloqueio da via. Porém, não podemos afirmar que isto é fenômeno causador das alterações metabólicas observadas.

Há também vários estudos correlacionando um aumento do tônus Th2 do tecido à mudança do perfil de adipócitos, promovendo uma condição que denominamos “*beigeing*”. O *beigeing* se caracteriza como uma mudança dos adipócitos brancos para um perfil mais semelhante ao de adipócitos bege ou marrons. Já foi visto, por exemplo, que a ausência de eosinófilos ou das citocinas IL-4 e 13 impede a biogênese de adipócitos bege, mesmo em condições de estresse térmico (frio), que causariam essa polarização normalmente. Por outro lado, a administração de IL-4 a camundongos aumenta a presença de tecido adiposo bege (QIU et al., 2014). Outros trabalhos descrevem o papel das células ILC2 na produção de peptídeos que podem agir diretamente nos adipócitos para regular positivamente a expressão de UCP1 *in vitro*, e que estas células são capazes de promover o processo de *beigeing* em modelo murino (BRESTOFF et al., 2015). Esses dados ajudariam a explicar o porquê da

Discussão

mudança no perfil do tecido adiposo, após a mudança do perfil de células imunes do tecido e recrutamento das células do tipo 2 na ausência da ACh. Considerando todos estes trabalhos abordando o impacto da sinalização via ACh no sistema imune (LUYER et al., 2005) juntamente aos nossos resultados, precisamos abordar com mais detalhes os mecanismos de controle que ocorrem no tecido adiposo relacionados à acetilcolina, e seu papel na homeostase tecidual, seja metabólica ou imunológica.

6. Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que o tônus colinérgico exerce um papel importante no controle da homeostase celular e metabólica, principalmente no tecido adiposo visceral. Essa regulação se dá principalmente pela manutenção da resposta Th2 e citocinas associadas ao padrão, o que pode parcialmente explicar porque animais com o bloqueio da via colinérgica apresentam melhor performance metabólica quando submetidos à dieta hiperlipídica.

7. Revisão Bibliográfica

AHMAD, S.; AHLUWALIA, T. S. Editorial: The Role of Genetic and Lifestyle Factors in Metabolic Diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. July, p. 1–3, 2019.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **About Metabolic Syndrome**. Disponível em: <<https://www.heart.org/en/health-topics/metabolic-syndrome/about-metabolic-syndrome>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

BALBO, S. L. et al. Vagotomy diminishes obesity in cafeteria rats by decreasing cholinergic potentiation of insulin release. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 625–633, 2016.

BARTNESS, T. J. et al. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 473–493, 2014.

BEALL, C.; HANNA, L.; ELLACOTT, K. L. J. CNS targets of adipokines. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 4, p. 1359–1406, 2017.

BÉNÉZECH, C. et al. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 819–828, 2015.

BORA, P.; MAJUMDAR, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2017.

BOROVIKOVA, L. V et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature Letters**, v. 405, p. 458–462, 2000.

BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–648, 2013.

BRESTOFF, J. R. et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 242–246, 2015.

CINTI, S. Pink Adipocytes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 9, p. 651–666, 2018.

Referências Bibliográficas

- COFFEY, J. C.; WALSH, D. Mesentery — a ‘ New ’ organ. n. May, p. 191–206, 2020.
- CORRÊA; HEYN; MAGALHAES. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 662, 2019.
- COSENTINO, M. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 632–642, 2007.
- COX, M. A. et al. Choline acetyltransferase-expressing T cells are required to control chronic viral infection. v. 644, n. February, p. 639–644, 2019.
- COX, M. A. et al. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 2, p. 120–133, 2020.
- CREWE, C.; AN, Y. A.; SCHERER, P. E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: Inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 74–82, 2017.
- CRUZ-MIGONI, S.; CAAMAÑO, J. Fat-associated lymphoid clusters in inflammation and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. DEC, p. 1–7, 2016.
- DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 147–190, 1914.
- DESPRES, J. et al. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome : Contribution to Global Cardiometabolic Risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 6, p. 1039–1049, 2008.
- DING, X. et al. IL-33-driven ILC2/eosinophil axis in fat is induced by sympathetic tone and suppressed by obesity. **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 1, p. 35–48, 2016.
- DUSTIN, M. L.; COLMAN, D. R. Neural and immunological synaptic relations. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 785–789, 2002.
- EBERL, G. et al. Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. **Science**, v. 348, n. 6237, 2015.
- EMAMALIPOUR, M.; ESFAHLAN, R. J. Implications of resistin in type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease : Impairing insulin function and inducing pro -

Referências Bibliográficas

inflammatory cytokines. n. May, p. 21758–21769, 2019.

FONSECA-ALANIZ, M. et al. Tecido Adiposo e Regulação Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216–29, 2006.

FONSECA, D. et al. Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity Article Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 354–366, 2015.

FORNY-GERMANO, L.; DE FELICE, F. G.; DO NASCIMENTO VIEIRA, M. N. The role of leptin and adiponectin in obesity-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, p. 1–19, 2019.

FRANCO, R. et al. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 400–407, 2007.

FUJII, T. et al. Expression of Choline Acetyltransferase mRNA and Protein in T-Lymphocytes. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 71, n. 7, p. 231–235, 1995.

FUJII, T. et al. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2017a.

FUJII, T. et al. **Expression and function of the cholinergic system in immune cells** **Frontiers in Immunology**, 2017b.

GALLE-TREGER, L. et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates ILC2-dependent airway hyperreactivity. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–13, 2016.

GARCÍA-RUBIO, J. et al. Cytometric analysis of adipose tissue reveals increments of adipocyte progenitor cells after weight loss induced by bariatric surgery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

GAUTAM, D. et al. Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 363–375, 2006.

GIORDANO, A. et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 5, p. 1243–1255, 2006.

Referências Bibliográficas

GIORDANO, A. et al. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 5, 2014.

GORDON, J.; BARNES, N. M. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: Agony or ecstasy? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 438–443, 2003.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.

GRUNDY, S. M. Obesity , Metabolic Syndrome , and Cardiovascular Disease. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2595–2600, 2004.

GUILHERME, A. et al. Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 4, p. 207–225, 2019.

HAN, S. J. et al. White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. **Immunity**, v. 47, n. 6, p. 1154- 1168.e6, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409–2415, 1995.

IKEDA, K.; MARETICH, P.; KAJIMURA, S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 191–200, 2018.

JACKSON-JONES, L. H. et al. Stromal Cells Covering Omental Fat-Associated Lymphoid Clusters Trigger Formation of Neutrophil Aggregates to Capture Peritoneal Contaminants. **Immunity**, v. 52, n. 4, p. 700- 715.e6, 2020.

JOHNSTON, G. R.; WEBSTER, N. R. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. **British Journal of Anaesthesia**, v. 102, n. 4, p. 453–462, 2009.

KABATA, H.; MORO, K.; KOYASU, S. The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. **Immunological Reviews**, v. 286, n. 1, p. 37–52, 2018.

KAMINSKI, D. A.; RANDALL, T. D. Adaptive immunity and adipose tissue biology.

Referências Bibliográficas

Trends in Immunology, v. 31, n. 10, p. 384–390, 2010.

KASSI, E. et al. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 48, 2011.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Sciences**, v. 72, n. 18–19, p. 2101–2109, 2003.

KERAGE, D. et al. Interaction of neurotransmitters and neurochemicals with lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 332, n. April, p. 99–111, 2019.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KOREN, O. et al. Human oral , gut , and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. **PNAS**, v. 108, p. 4592–4598, 2011.

KRAL, J. G. Vagotomy as a treatment for morbid obesity. **The Surgical clinics of North America**, v. 59, n. 6, p. 1131–1138, 1979.

KRAL, J. G. Behavioral effects of vagotomy in humans. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 9, n. 1, p. 273–281, 1983.

KREIER, F. et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat - Functional implications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1243–1250, 2002.

KREIER, F.; BUIJS, R. M. Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries [1]. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 1, p. 2006–2008, 2007.

LEE, Y. H. et al. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 480–491, 2012.

LEIRIA, L. O. et al. 12-Lipoxygenase Regulates Cold Adaptation and Glucose Metabolism by Producing the Omega-3 Lipid 12-HEPE from Brown Fat. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 768- 783.e7, 2019.

LEIRIA, L. O. S. et al. Increased Airway Reactivity and Hyperinsulinemia in Obese Mice Are Linked by ERK Signaling in Brain Stem Cholinergic Neurons. **Cell Reports**,

Referências Bibliográficas

v. 11, n. 6, p. 934–943, 2015.

LEIRIA, L. O. S.; MARTINS, M. A.; SAAD, M. J. A. Obesity and asthma: Beyond TH2 inflammation. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 2, p. 172–181, 2015.

LEKKAS, D.; PASCHOS, G. K. The circadian clock control of adipose tissue physiology and metabolism. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 219, n. April, p. 66–70, 2019.

LEÓN-PONTE, M.; AHERN, G. P.; O'CONNELL, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3139–3146, 2007.

LIU, R. H.; MIZUTA, M.; MATSUKURA, S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 1, p. 52–58, 2004.

LOEWI, O. über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. **Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 207, n. 1, p. 1–7, 1921.

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.

LUYER, M. D. et al. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1023–1029, 2005.

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.

MAHLAKÖIV, T. et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. **Science Immunology**, v. 4, n. 35, p. 1–13, 2019.

MARTELLI, D.; MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 182, p. 65–69, 2014.

Referências Bibliográficas

- MAYO CLINIC, S. **Metabolic syndrome**. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/metabolic-syndrome/symptoms-causes/syc-20351916>>. Acesso em: 12 jan. 2020.
- MORIYAMA, S. et al. B2-Adrenergic Receptor-Mediated Negative Regulation of Group 2 Innate Lymphoid Cell Responses. **Science**, v. 359, n. 6379, p. 1056–1061, 2018.
- MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. JAN, p. 1–19, 2012.
- MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. 113–127, 2014.
- ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.
- OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–374, 2012.
- PACHECO, R. et al. Glutamate Released by Dendritic Cells as a Novel Modulator of T Cell Activation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 6695–6704, 2006.
- PAOLICELLI, R. C.; ANGIARI, S. Microglia immunometabolism: From metabolic disorders to single cell metabolism. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 94, n. April, p. 129–137, 2019.
- PARIMISSETTY, A. et al. Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.
- PEREZ-SHIBAYAMA, C. et al. Fibroblastic reticular cells initiate immune responses in visceral adipose tissues and secure peritoneal immunity. **Science Immunology**, v. 3, n. 26, 2018.
- PINHEIRO, N. M. et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.
- PINHEIRO, N. M. et al. Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. **FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p.

Referências Bibliográficas

320–332, 2017.

PRADO, V. F. et al. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, p. 601–612, 2006.

QIAN, J. et al. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of nave CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. **Genes and Immunity**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 2011.

QIU, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292–1308, 2014.

QIU, Y.; YUPING, P.; JIANHE, W. Immunoregulatory role of neurotransmitters. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, n. 3, p. 223–231, 1996.

REARDON, C. et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **PNAS**, n. 9, p. 3459–3464, 2013.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98–101, 2011.

SEALE, P. et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 961–967, 2008.

SILVA, H. M. et al. Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 4, p. 786–806, 2019.

TALLINI, Y. N. et al. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. p. 391–397, 2006.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. December, p. 853–859, 2002.

TRACEY, K. J. Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1017–1021, 2005.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329–339, 2001.

Referências Bibliográficas

TRAYHURN, P.; BING, C.; WOOD, I. S. The WALTHAM International Nutritional Sciences Symposia Adipose Tissue and Adipokines — Energy Regulation from the. v. 136, n. 8, p. 1935–1939, 2006.

TREMAROLI, V. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, p. 1–8, 2012.

VENTURA, A. L. M. et al. Cholinergic system: Revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v. 37, n. 2, p. 74–80, 2010.

VILLARROYA, F. et al. Toward an Understanding of How Immune Cells Control Brown and Beige Adipobiology. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 954–961, 2018.

WISSE, B. E. The Inflammatory Syndrome : The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. n. 16, p. 2792–2800, 2004.

WON PARK, K.; HALPERIN, D. S.; TONTONOZ, P. Before They Were Fat: Adipocyte Progenitors. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 454–457, 2008.

WORTIS, H. H. To B-1 or not to B-1. **Nature Immunology**, v. 18, n. 4, p. 365–366, 2017.

WU, L. et al. IL-10–producing B cells are enriched in murine pericardial adipose tissues and ameliorate the outcome of acute myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 43, p. 201911464, 2019.

YANG, Z. et al. IL-33-induced alterations in murine intestinal function and cytokine responses are MyD88, STAT6, and IL-13 dependent. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 304, n. 4, p. 381–389, 2013.

ZDANOWSKI, R. et al. Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. **Central European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 373–379, 2015.

ZHU, Q. et al. Neuroendocrine regulation of energy metabolism involving different types of adipose tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1–22, 2019.

ZIMMER, H. G. Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the

Referências Bibliográficas

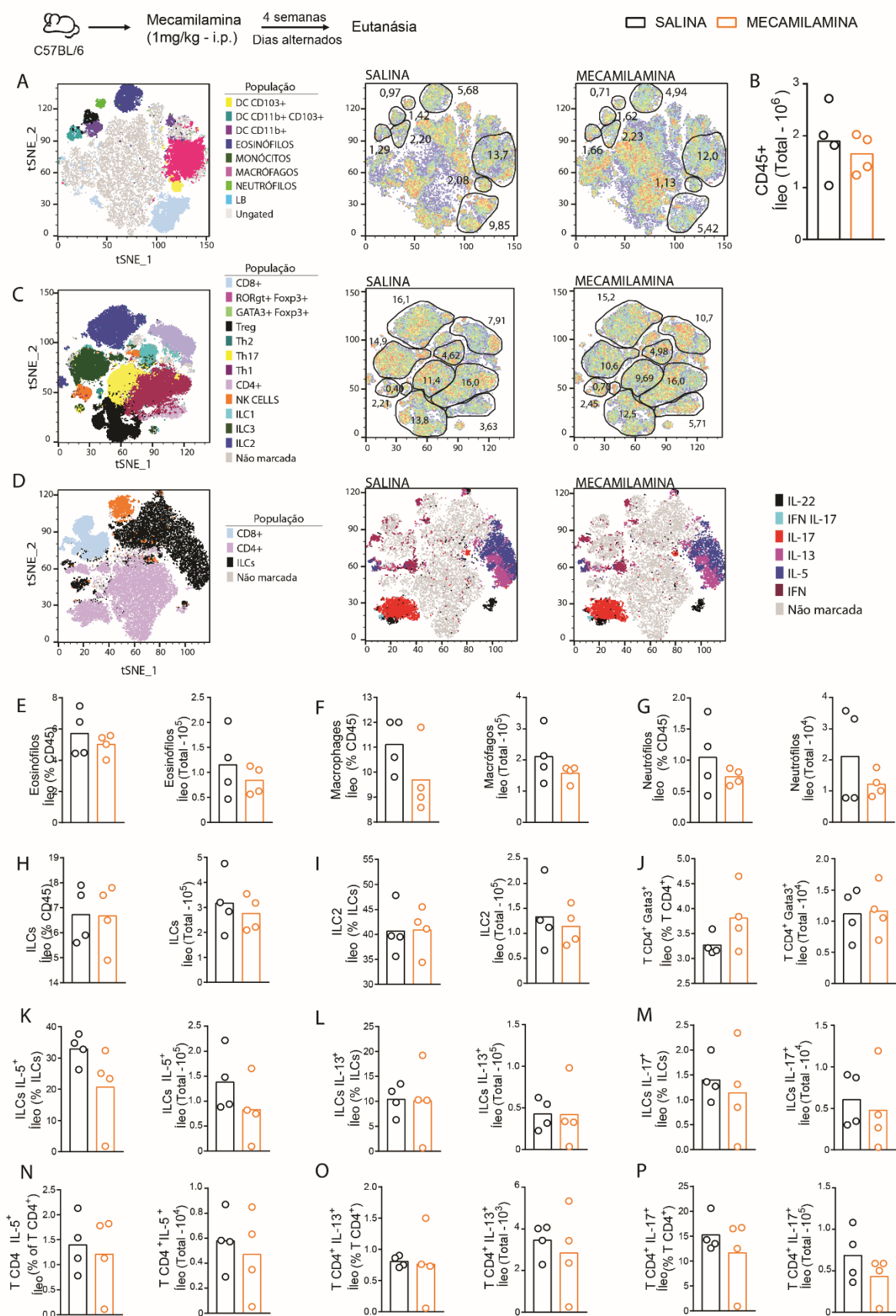
heart. **Clinical cardiology**, v. 29, n. 3, p. 135–136, 2006.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Animal	Contagem total de células	Peso mesentérico (mg)	Ajuste por peso (500mg)
WT 1	2,80E+06	556	2,52E+06
WT 2	2,65E+06	465,7	2,85E+06
WT 3	1,88E+06	383,4	2,45E+06
WT 4	4,71E+05	293,3	8,03E+05
VACht 1	3,14E+05	238,8	6,57E+05
VACht 2	1,56E+05	127	6,14E+05
VACht 3	1,63E+05	227,5	3,58E+05
VACht 4	1,21E+05	232,9	2,60E+05

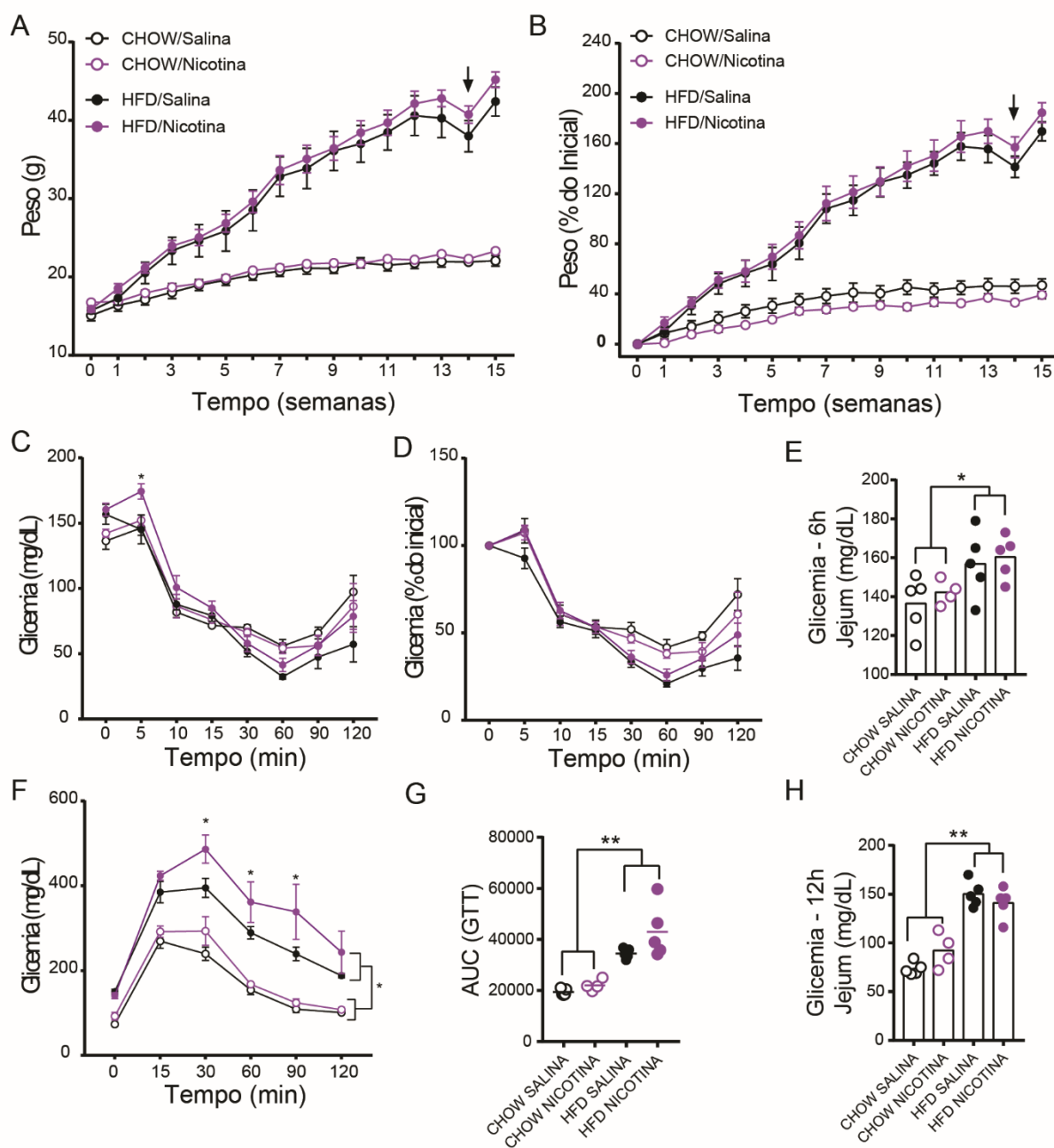
MATERIAL SUPLEMENTAR 1 – Quadro representativo do número total de células nos mesentérios dos camundongos WT e VACht KD e ajuste do número pelo peso do tecido.

Material Suplementar



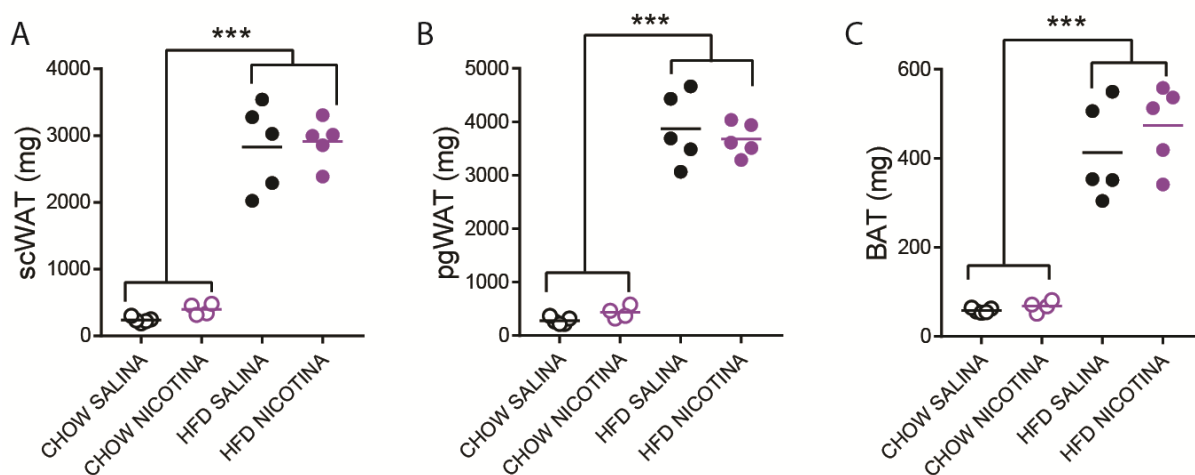
MATERIAL SUPLEMENTAR 2 – Caracterização das populações celulares presentes no intestino delgado de camundongos tratados com salina ou mecamilamina.

Material Suplementar



MATERIAL SUPLEMENTAR 3 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais tratados com nicotina sob dieta hiperlipídica.

Material Suplementar



MATERIAL SUPLEMENTAR 4 - Peso dos tecidos adiposos de animais tratados com nicotina sob dieta hiperlipídica.

ANEXOS

RHOSTER

DIETA HIPERLIPÍDICA 60% kcal lipídios

RH19531MS

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	23,5	18,4
Carboidrato	27,3	21,3
Gordura	34,3	60,3
Dieta 5,1 kcal/g	***	***

*Dieta Purificada para Indução de Obesidade

*Produzida em PASTA - pacotes de 500g

*Quantidade mínima 3kg

*Prazo de Entrega: até 15 dias

Ingredientes

Caseína SIGMA, Amido Dextrinizado, Gordura Animal, Sacarose, Óleo de Soja, Celulose, Mix Mineral RH9502*, Mix Vitamínico RH9503**, Fosfato de Cálcio bibásico, L-Cistina, Bitartrato de Colina, Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) Sigma-Aldrich.

Mais Informações

*Mix Mineral AIN-93M

**Mix Vitamínico AIN-93

***Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

60% das kcal totais são provenientes dos ingredientes lipídicos.

Perfil aproximado de ácidos graxos: 37% saturados, 47% monoinsaturados,

16% poliinsaturados.

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av. Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd.Salete - Araçoiaba da Serra/SP - CEP: 18190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr.Estadual 178.070.220.114

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DA DIETA – HIGH FAT DIET - RHOSTER®

ANTICORPO	CLONE
Ly6G	127626
CD103	46-1031-82
MHC II	M5/114.15.2
Ly6C	HK1.4
CD64	X54-5/7.1
CD11b	101257
CD45	103151
CD11c	117336
Siglec F	562757
Thy1.2	105331
NK1.1	108736
GATA-3	560077
FOXP3	12-5773-82
Ror- γ t	46-6981-82
Ki67	652426
CD44	IM7
Tbet	EBIO4B10
TCR- β	47-5961-82
CD4	100547
CD8b	YTS156.7.7
IL-5	TRFK5
IL-13	Ebio13a
IL-17	Ebio17B7
IL-22	Poly5164
IL-4	RUO 11B11
IFN- γ	XMG1.2
L/D	----
FC Block (anti-CD16/32)	2.4G2

ANEXO 2 – QUADRO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS.