

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 Biomédicas - São Paulo - SP - Av. Dr. Arceburgo Cambiore, 461 - CEP: 05508-900
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 5081-3103 - 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.
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2** – Estratégias de gate para identificação das populações celulares de origem linfoide. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3** – Estratégias de gate para identificação do perfil de produção de citocinas.
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** – t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding – tSNE. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, scWAT e baço de camundongos WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6** – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfoide nos tecidos de animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7** – Caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4+, T CD8+ e células T TCR- $\gamma\delta$ em animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8** – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 9** – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4+ em animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10** – Expressão de CD44 e Ki67 nas células linfoides do mesWAT, scWAT e baço de animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11** - Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT, mLN e baço de camundongos tratados com salina e mecamilamina. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12** – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfoide nos tecidos de camundongos tratados com salina e mecamilamina... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13** – Caracterização fenotípica das células T CD4+, células T TCR- $\gamma\delta$ e células T CD8+ em animais tratados com salina ou mecamilamina. ... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 14** – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides em animais tratados com salina ou mecamilamina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 15 - Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ em animais tratados com salina ou mecamilamina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 16 – Expressão de CD44 e Ki67 nas células do mesWAT, mLN e baço de animais tratados com a mecamilamina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 17 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos após vagotomia unilateral.... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 18 – Expressão de fatores de transcrição pelas células de origem linfóide nos tecidos de animais vagotomizados..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19 – Caracterização fenotípica das células T CD4⁺, T CD8⁺ e células TCR- $\gamma\delta$ e em animais vagotomizados..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20 - Perfil de produção de citocinas pelas células linfóides em animais vagotomizados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 21 – Caracterização de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ em animais vagotomizados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VACht KD tratados com dieta hiperlipídica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais WT e VACht KD tratados com dieta hiperlipídica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25 - Peso corpóreo e perfil metabólico de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26 – Peso dos tecidos adiposos de animais com bloqueio farmacológico da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais com inibição farmacológica da via colinérgica tratados com dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28 – Peso corpóreo e o perfil metabólico de animais vagotomizados e tratados com dieta hiperlipídica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29 – Análise da gordura corporal e metabolismo basal dos animais VgX tratados com dieta hiperlipídica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30 – Histologia do scWAT, pgWAT, BAT e fígado de animais SHAM e VgX tratados com dieta hiperlipídica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31 – Caracterização das populações celulares presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do mesWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do scWAT de animais VACht KD submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34 – Caracterização das populações celulares mieloides presentes no mesWAT e scWAT de camundongos VgX submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 35 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do mesWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36 – Perfil de produção de citocinas pelas células linfoides do scWAT de animais VgX submetidos à dieta hiperlipídica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 37 – Captação de 2-NBDG pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38 – Captação de Bodipy pelas células do sistema imune do mesWAT ou scWAT de animais WT e VACht KD. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 39 – Análise da inervação colinérgica em diferentes tecidos adiposos viscerais. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 40 – Análise da inervação colinérgica em tecidos adiposos parietais e no intestino. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41 – Análise da expressão de ChAT pelas células do sistema imune presentes no mesWAT. **Erro! Indicador não definido.**

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

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 ABREVIÇÕES

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 linfoide 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 hydroxilase*”

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	Erro! Indicador não definido.
3.1 – Camundongos	Erro! Indicador não definido.
3.2 – Tratamento com agonista e antagonista colinérgico.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 – Cirurgia de vagotomia unilateral	Erro! Indicador não definido.
3.4 - Dieta hiperlipídica e indução de obesidade	Erro! Indicador não definido.
3.5 – Pesagem semanal e testes de tolerância à glicose/insulina ...	Erro! Indicador não definido.
3.6 – Análise da distribuição de gordura corpórea....	Erro! Indicador não definido.
3.7 – Análise do perfil metabólico dos animais	Erro! Indicador não definido.
3.8 – Tratamento com 2-NBDG e Bodipy	Erro! Indicador não definido.
3.9 – Processamento dos tecidos e extração celular	Erro! Indicador não definido.
3.10 – Análise das populações celulares por citometria de fluxo.....	Erro! Indicador não definido.

3.11 – tSNE – <i>t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding</i> ...	Erro! Indicador não definido.
3.12 – Histologia	Erro! Indicador não definido.
3.13 – Análise estatística	Erro! Indicador não definido.
4. Resultados	Erro! Indicador não definido.
4.1 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos VACht KD ^{HOM}	Erro! Indicador não definido.
4.2 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos após tratamento com mecamilamina	Erro! Indicador não definido.
4.3 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de camundongos submetidos à vagotomia unilateral	Erro! Indicador não definido.
4.4 – Perfil metabólico de animais VACht KD ^{HOM} submetidos à dieta hiperlipídica	Erro! Indicador não definido.
4.5 – Perfil metabólico de animais tratados com mecamilamina submetidos à dieta hiperlipídica.....	Erro! Indicador não definido.
4.6 – Perfil metabólico de animais vagotomizados submetidos à dieta hiperlipídica	Erro! Indicador não definido.
4.7 – Perfil das células imunes presentes no tecido adiposo de animais obesos após bloqueio da via colinérgica.....	Erro! Indicador não definido.
4.8 – Perfil metabólico das células do sistema imune no tecido adiposo de animais após inibição da via colinérgica	Erro! Indicador não definido.
4.9 – Avaliação da inervação colinérgica e produção celular de acetilcolina no tecido adiposo.....	Erro! Indicador não definido.
5. Discussão.....	Erro! Indicador não definido.
6. Conclusões.....	38
7. Revisão Bibliográfica	39
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

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, beges, 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 beges 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

(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.

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.

