



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ÍCARO ANDRADE RODRIGUES DO CARMO

**Caracterização do perfil de citocinas e atividade da IDO em modelo de co-cultura
in vitro e modelo *ex vivo* de tecido adiposo frente a estímulo inflamatório**

Florianópolis

2020

Ícaro Andrade Rodrigues do Carmo

**Caracterização do perfil de citocinas e atividade da IDO em modelo de co-cultura
in vitro e modelo *ex vivo* de tecido adiposo frente a estímulo inflamatório**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de
Mestre em Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Branco Filippin
Monteiro

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carmo, Ícaro Andrade Rodrigues

Caracterização do perfil de citocinas e atividade da IDO em modelo de co-cultura in vitro e modelo ex vivo de tecido adiposo frente a estímulo inflamatório / Ícaro Andrade Rodrigues Carmo ; orientadora, Fabíola Branco Filippin-Monteiro, 2020.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Co-cultura. 3. IDO. 4. Inflamação. 5. Obesidade. I. Branco Filippin-Monteiro, Fabíola. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Ícaro Andrade Rodrigues do Carmo

**Caracterização do perfil de citocinas e atividade da IDO em modelo de co-cultura
in vitro e modelo ex vivo de tecido adiposo frente a estímulo inflamatório**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Edson Mendes de Oliveira
University of Cambridge

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Prof.^a Dr.^a Fabíola Branco Filippin Monteiro
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha mãe, Salete, que continuou me apoiando nesta etapa tão importante da minha jornada acadêmica até aqui.

Agradeço também ao meu falecido pai, sem o qual eu não poderia estar aqui.

Agradeço à minha namorada e companheira Dayane, que me forneceu um enorme suporte emocional e me auxiliou na formatação deste trabalho, demonstrando amor e dedicação em cada etapa do processo.

À professora Tânia Beatriz Crekzynski-Pasa, que gentilmente cedeu o laboratório para muitos dos experimentos que realizei.

À professora Elenara Lemos Senna e os demais membros do colegiado, que me auxiliaram no processo de adiamento da defesa frente à pandemia.

Aos professores Filipe Carvalho e Júlia Dubois e à Dr^a Laura Sartori pelas valiosas contribuições durante a qualificação.

À Julia Cisilotto, à Carol Dumke e à Louise Purnhagen por sua paciência e dedicação em diversas etapas do andamento deste trabalho.

Às meninas do CentralCrom, que gentilmente me ajudaram com o HPLC mesmo não fazendo parte da equipe do laboratório.

À Bárbara Czerniak, à Malu Buchele, à Bruna Sigal e aos demais colegas do LAITA/LAPEO que direta ou indiretamente contribuíram para eu chegar até aqui.

À minha orientadora, Fabíola Branco Filippin-Monteiro, que tem me orientado desde o início da minha vida de pesquisa científica e que certamente moldou muitas das minhas capacidades e do meu jeito de trabalhar com ciência.

E a todas as demais pessoas que eu com certeza estou esquecendo de citar aqui, mas que em algum momento deram suas contribuições (acadêmicas ou de amizade) e merecem todo o carinho e gratidão.

E ainda ao meu “Eu” do passado, por mesmo diante de alguns problemas e percalços, ter persistido e continuado em frente.

MUITO OBRIGADO!!!!!!!!!!

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

(Albert Einstein, 1879 - 1955)

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde mundial, relacionado a diversas comorbidades, incluindo a depressão. O triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina e perturbações nesta via metabólica podem levar ao surgimento de transtornos psiquiátricos. A enzima IDO é importante neste cenário, pois direciona o triptofano para a via das quinureninas e o aumento da concentração dos metabólitos desta via está associado à depressão. Esta enzima se encontra excessivamente ativada em quadros inflamatórios, como na inflamação crônica de baixo grau produzida pela obesidade. No entanto, a participação do tecido adiposo no aumento da atividade da IDO que se observa na obesidade não está elucidada, fazendo-se necessário o emprego de avaliações mais detalhadas sobre o tema. Neste sentido, os ensaios biológicos *in vitro* permitem a realização de análises mais convenientes e específicas em comparação a modelos *in vivo* ou estudos clínicos. Modelos de co-cultura celular têm sido utilizados como forma de mimetizar melhor as interações dos diferentes tipos celulares presentes em um tecido sem abrir mão das vantagens dos ensaios *in vitro*. Paralelamente, estudos com modelos *ex vivo* apresentam diversas das vantagens dos estudos *in vitro* e, ao mesmo tempo, a capacidade de simularem o que ocorre no tecido quando dentro do organismo. Diante deste cenário, foi estabelecido um modelo *in vitro* de co-cultura das linhagens murinas de adipócitos 3T3-L1 e macrófagos J774, a fim de caracterizá-lo quanto à capacidade de acumular lipídios, o perfil de liberação das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e adipocinas leptina e adiponectina e a atividade da IDO frente ao estímulo inflamatório com INF- γ . Também se estabeleceram modelos *ex vivo* de tecido adiposo murino subcutâneo e visceral, avaliados quanto ao perfil de liberação das mesmas citocinas e à expressão do gene IDO1 frente ao mesmo estímulo inflamatório. Nenhum dos modelos apresentou concentrações detectáveis de TNF- α . O modelo de co-cultura não foi capaz de produzir adiponectina ou IL-10 e não sofreu influência do estímulo com INF- γ na atividade da IDO ou na produção de IL-4 e leptina. No entanto, o modelo demonstrou ter capacidade de acumular lipídios intracelulares quando estimulado com meio de indução adipogênica e apresentou aumento da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 ($54,5 \pm 42,2$ ng/mL versus $208,0 \pm 59,7$ ng/mL, $p < 0,05$) frente ao estímulo inflamatório. Não foi possível detectar produção de IL-6 nos modelos *ex vivo* de tecido adiposo. O tecido adiposo subcutâneo apresentou menor concentração de leptina (1180 ng/mL versus 670 ng/mL, N = 1) quando estimulado com INF- γ e ambos apresentaram concentração aparente da citocina anti-

inflamatória IL-10 cerca de seis vezes menor sob o estímulo inflamatório (N = 1). Ainda, o tecido subcutâneo foi capaz de expressar IDO1, apresentando tendência de aumento da expressão relativa do gene em duas vezes e meia na presença de INF- γ . Conclui-se que, diante da complexidade do tecido adiposo, o modelo de co-cultura apresenta limitações que impossibilitaram um estudo detalhado da IDO, mas pode ser utilizado para avaliação do acúmulo de lipídios e produção de IL-6. Os modelos *ex vivo* parecem ser adequados ao estudo da inflamação do tecido adiposo e ao estudo da via das quinureninas neste tecido, necessitando mais investigações para confirmar estas possibilidades.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide health issue, related to several comorbidities, including depression. Tryptophan is the precursor of the neurotransmitter serotonin, and disturbances in this metabolic pathway may lead to the development of psychiatric disorders. The enzyme IDO is essential in this scenario, as it directs the metabolism of tryptophan into the kynurenine pathway, and the increase in the levels of this pathway metabolites is tied to depression. This enzyme is excessively activated in inflammatory conditions, such as the chronic low-grade inflammation produced by obesity. However, the role of the adipose tissue in the observed increase of IDO activity in obesity is not clear, creating the need for more detailed evaluations on the topic. In this regard, *in vitro* biological assays allow the accomplishment of more convenient and specific assessments when compared to *in vivo* models or clinical assays. Co-culture models have been used as a way to better mimic the interactions between the different cell types within a tissue without giving up the benefits of *in vitro* assays. In parallel, studies with *ex vivo* models offer several of the advantages of *in vitro* studies and, at the same time, the capability to simulate what occurs in the tissue when inside the organism. In this scenario, we established an *in vitro* model of co-culture of the murine lines of 3T3-L1 adipocytes and J774 macrophages, to characterize it on the capability of lipid accumulation, IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α cytokines and leptin and adiponectin adipokines releasing profile, and IDO activity in front of the inflammatory stimulus with INF- γ . We also established *ex vivo* models of subcutaneous and visceral adipose tissue, evaluated on the releasing profile of the same cytokines and the expression of IDO1 gene in front of the same inflammatory stimulus. No one of the models showed detectable levels of TNF- α . The co-culture model was unable to produce adiponectin or IL-10 and was not influenced by the stimulation with INF- γ on IDO activity on IL-4 and leptin production. Nevertheless, the model showed to be capable of accumulating intracellular lipids when stimulated with adipogenic inducing medium and exhibited an increase in the pro-inflammatory IL-6 cytokine ($54,5 \pm 42,2$ ng/mL versus $208,0 \pm 59,7$ ng/mL, $p < 0,05$) in the presence of the inflammatory stimulus. It was not possible to detect IL-6 production in the *ex vivo* adipose tissue models. The subcutaneous adipose tissue showed lower levels of leptin (1180 ng/mL versus 670 ng/mL, $N = 1$) when stimulated with INF- γ and both tissues exhibited levels of the anti-inflammatory IL-10 cytokine around six times lower under the inflammatory stimulus ($N = 1$). Yet, the subcutaneous tissue was able to express IDO1,

showing a tendency of increase of the relative expression of the gene of two and a half times in the presence of INF- γ . We conclude that, in the face of the complexity of the adipose tissue, the co-culture model presents limitations that did not allow for a detailed study of IDO. Still, it can be used for the evaluation of lipid accumulation and IL-6 production. The *ex vivo* models might be suited for the study of adipose tissue inflammation and the study of the kynurenine pathway in this tissue, requiring further investigation to confirm these possibilities.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Tecido adiposo com seus principais constituintes.
- Figura 2 – Distribuição do tecido adiposo em camundongos e em humanos.
- Figura 3 – Relação entre obesidade e inflamação.
- Figura 4 – Relação entre IMC e depressão.
- Figura 5 – Vias metabólicas do L-triptofano.
- Figura 6 – Via das quinureninas.
- Figura 7 – Genes envolvidos na adipogênese.
- Figura 8 – Fotomicrografias de 3T3-L1 e J774.
- Figura 9 – Pré-adipositos 3T3-L1.
- Figura 10 – Células 3T3-L1 após diferenciação adipogênica
- Figura 11 – 3T3-L1 durante a diferenciação adipogênica.
- Figura 12 – Co-cultura de 3T3-L1 e J774 pré diferenciação adipogênica.
- Figura 13 – Co-cultura de 3T3-L1 e J774 pós diferenciação adipogênica.
- Figura 14 – Histogramas representativos obtidos pela análise em citômetro de fluxo de células marcadas com corante fluorescente Nile Red.
- Figura 15 – Valores absolutos de adiponectina pelo método ELISA.
- Figura 16 – Valores absolutos de leptina pelo método ELISA.
- Figura 17 – Valores absolutos de IL-4 pelo método ELISA.
- Figura 18 – Valores absolutos de IL-6 pelo método ELISA.
- Figura 19 – Valores absolutos de IL-10 pelo método ELISA.
- Figura 20 – Concentração de triptofano em 3T3-L1 e co-cultura.
- Figura 21 – Concentração de quinurenina em 3T3-L1 e co-cultura.
- Figura 22 – Atividade calculada de IDO em 3T3-L1 e co-cultura.
- Figura 23 - Δ -CT do gene IDO1 frente ao estímulo com INF- γ .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre IMC e classificação de peso.

Tabela 2 – Tabela esquemática do estabelecimento de co-cultura.

Tabela 3 – Tabela esquemática do tratamento do tecido adiposo *ex vivo*.

Tabela 4 – Primers utilizados na metodologia de qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

C/EBPs – Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT

C/EBP- α – Proteína de ligação ao intensificador de CCAAT-alfa

C/EBP- β – Proteína de ligação ao intensificador de CCAAT-beta

C/EBP- δ – Proteína de ligação ao intensificador de CCAAT-delta

CAAT – Citosina-citosina-adenosina-adenosina-timidina

CS – Soro de bezerro

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio imunoenzimático

Glut4 – Receptor de Glicose 4

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico

HPA – Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal

IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

IGF-1 – Fator de crescimento tipo-insulina 1

IgG – Imunoglobulina G

IL-10 – Interleucina-10

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de Massa Corporal

INF- γ – Interferon-gama

M1 – Macrófago classicamente ativado (pró-inflamatório)

M2 – Macrófago alternativamente ativado (anti-inflamatório)

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

MDI – Meio de indução

NMDA – N-metil-D-aspartato

NR – *Nile Red*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PPAR γ – Proliferadores de peroxissomas tipo gama

SAA – Amiloide Sérica A

SFB – Soro fetal bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

TPH – Triptofano hidroxilase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	OBESIDADE.....	16
2.2	O TECIDO ADIPOSEO.....	17
2.3	OBESIDADE E INFLAMAÇÃO.....	20
2.4	OBESIDADE E DEPRESSÃO.....	23
2.5	METABOLISMO DO TRIPTOFANO.....	24
2.6	A VIA DAS QUINURENINAS.....	26
2.7	ADIPOGÊNESE.....	28
2.8	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	30
2.9	ESTUDOS <i>EX VIVO</i>	31
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	REAGENTES.....	33
4.2	LINHAGENS CELULARES.....	33
4.3	DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	34
4.4	AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	35
4.5	ESTABELECIMENTO DO MODELO DE CO-CULTURA.....	35
4.6	ANÁLISE DA LIPOGÊNESE DOS MODELOS DE CO-CULTURA.....	37
4.7	ESTÍMULO INFLAMATÓRIO COM INF- γ	37
4.8	OBTENÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO <i>EX VIVO</i>	38
4.9	PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E ADIPOCINAS SOB ESTÍMULO COM INF- γ	38
4.10	ATIVIDADE DA ENZIMA IDO <i>IN VITRO</i>	39
4.11	EXPRESSÃO DO GENE IDO1 NO TECIDO ADIPOSEO <i>EX VIVO</i>	39
4.11.1	Extração de RNA total.....	39
4.11.2	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	40
4.11.3	Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).....	40
5.	RESULTADOS.....	42

5.1 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	42
5.2 ESTABELECIMENTO DOS MODELOS DE CO-CULTURA.....	45
5.3 ANÁLISE DA LIPOGÊNESE DOS MODELOS DE CO-CULTURA.....	47
5.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E ADIPOCINAS EM SISTEMA DE MONOCULTURA, CO-CULTURA E TECIDO ADIPOSO MURINO.....	49
5.5 ATIVIDADE DA ENZIMA IDO <i>IN VITRO</i>	52
5.6 EXPRESSÃO DO GENE IDO1 NO TECIDO ADIPOSO <i>EX VIVO</i>	54
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	62
9. ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos problemas de saúde pública mais relevantes no mundo e é considerado o distúrbio nutricional mais importante tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (HRUBY, HU, 2015; TREMMEL et al., 2017). Este distúrbio está associado a diversas comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares e depressão (HASLAM, JAMES, 2005). Já é comprovado que indivíduos obesos apresentam maiores taxas de depressão em comparação à população geral (ONYIKE et al, 2003).

A depressão é um conjunto de diferentes transtornos mentais, caracterizados pela existência de episódios depressivos (RAY et al, 2017). Esta doença está associada a uma alta taxa de mortalidade, perda de qualidade de vida e de produtividade (LÉPINE, BRILEY, 2011). O aminoácido triptofano é o precursor metabólico do neurotransmissor serotonina e perturbações nesta via metabólica costumam acompanhar casos de depressão (JENKINS et al., 2016). A enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) desempenha um importante papel neste cenário, ao catalisar o metabolismo do triptofano na via das quinureninas, reduzindo a disponibilidade deste aminoácido para a síntese de serotonina (BONACCORSO et al, 2002). Da mesma forma, o aumento da concentração da quinurenina, o primeiro metabólito estável da IDO (HAYASHI, 1996), está independentemente associado à depressão e ao déficit cognitivo (SWARDFAGER et al., 2009).

A IDO tem sua atividade aumentada frente a estímulos inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias como o interferon-gama ($INF-\gamma$) e o fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$) são capazes de induzir sua expressão (O'CONNOR et al., 2009). A inflamação de baixo grau é uma característica comum à obesidade (TRAYHURN, WOOD, 2004), e indivíduos obesos apresentam concentrações de citocinas pró-inflamatórias mais elevadas do que indivíduos magros (GREGOR, HOTAMISLIGIL, 2011). A obesidade também induz uma redução das concentrações do aminoácido triptofano (FINKELSTEIN et al., 1982) e, em humanos, esta redução está diretamente relacionada à atividade elevada da enzima IDO consequente ao estado inflamatório crônico na obesidade (BRANDACHER et al., 2006).

A enzima IDO é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo o tecido adiposo (CAMPBELL et al., 2014). O gene IDO1, que codifica a enzima, tem sua expressão aumentada tanto no fígado quanto no tecido adiposo de pacientes obesos do sexo

feminino, em comparação a controles magros do mesmo sexo. O aumento da expressão deste gene está associado à infiltração exacerbada de macrófagos no tecido adiposo que ocorre na obesidade (WOLOWCZUK et al, 2012). Esta infiltração é capaz de produzir alterações na via das quinureninas, levando ao aumento das concentrações de seus metabólitos (FAVENNEC et al., 2015). Ainda se faz necessário, no entanto, elucidar o perfil de expressão do gene IDO1 e a atividade da IDO no tecido adiposo frente à presença ou ausência de estímulos inflamatórios, a fim de associar definitivamente o aumento da atividade da IDO à inflamação de baixo grau que ocorre na obesidade.

Neste cenário, desenvolveu-se um modelo de co-cultura celular utilizando as linhagens murinas 3T3-L1 (pré-adipócito) e J774 (macrófago), com o objetivo de mimetizar um tecido adiposo *in vitro* para a avaliação da via das quinureninas neste tecido. Amostras de tecido adiposo murino *ex vivo* foram utilizadas para complementar esta avaliação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença na qual há um acúmulo excessivo de gordura corporal. Considera-se que o indivíduo é obeso quando seu índice de massa corporal (IMC), calculado dividindo-se o peso corporal pelo quadrado da altura, é maior que 30; quando o IMC é maior que 40, ele é considerado um obeso mórbido (WHO, 2016) (Tabela 1). Esta doença, bem como suas comorbidades associadas, tende a resultar em uma redução significativa da qualidade de vida dos indivíduos afetados.

As comorbidades associadas à obesidade incluem resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e câncer (SCHELBERT, 2009), e são capazes de gerar um aumento significativo dos gastos com o sistema de saúde. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1 bilhão e 900 milhões de adultos no mundo todo apresentavam excesso de peso em 2016; destes, cerca de 650 milhões de indivíduos (39% dos homens e 40% das mulheres) eram considerados obesos (WHO, 2016).

Tabela 1 – Relação entre IMC e classificação de peso.

Classificação	Índice de Massa Corporal (kg/m ²)
Abaixo do Peso	< 18.5
Normal	18.5 – 24.9
Sobrepeso	25 – 29.9
Obeso	≥ 30
Grau I	30 – 34.9
Grau II	35 – 39.9
Grau III (mórbido)	≥ 40

Classificação do grau de obesidade conforme o índice de massa corporal. Fonte: adaptado de WHO, 2016.

No Brasil, os custos de hospitalização diretamente relacionados à obesidade representam cerca de 3% do total de custos do Sistema Único de Saúde (SUS) para homens e quase 6% do total de custos para mulheres (SICHIERI et al., 2007). Este cenário pode ser explicado diante do fato de que 55,7% da população brasileira apresenta excesso

de peso e este índice vêm aumentando ao longo dos anos (PENIDO, 2019). Em torno de 18% dos homens e 16% das mulheres no Brasil apresentam IMC maior que 30, sendo considerados obesos (ANS, 2017).

O aumento crescente do número de obesos indica a grande participação do ambiente na gênese da doença, com hábitos dietéticos, sedentarismo e fatores psicossociais, responsáveis por 95% dos casos (ANS, 2017). Diante deste cenário, entende-se que combate à obesidade, ainda que requira atenção à dimensão biológica individual, necessita de uma abordagem que contemple a consideração das pressões ambientais, gerando políticas públicas capazes de efetivar o enfrentamento da obesidade diante de um ambiente obesogênico (DIAS et al., 2017).

2.2 O TECIDO ADIPOSEO

Outrora considerado um tecido cuja função era apenas a de reserva energética na forma de triacilgliceróis, o tecido adiposo é hoje considerado um órgão metabolicamente dinâmico, capaz de produzir e secretar compostos biologicamente ativos que regulam a homeostase (COELHO et al., 2013).

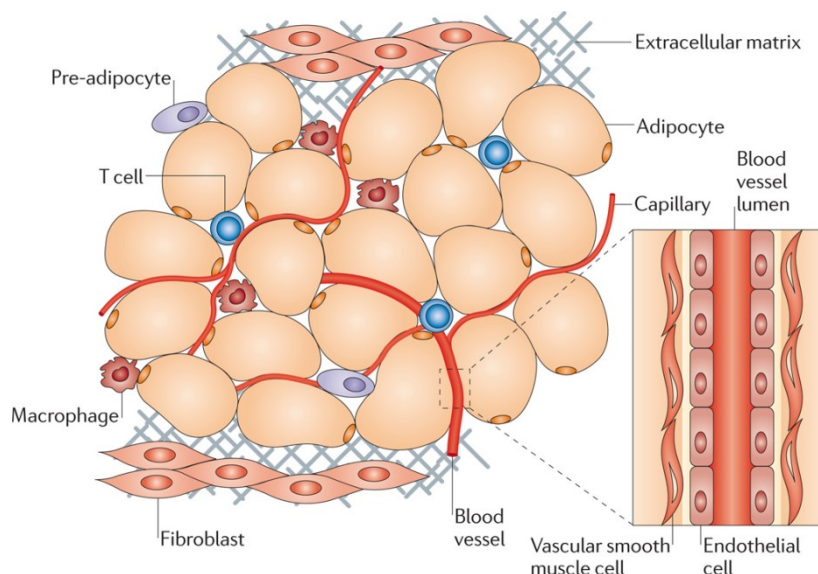
Este tecido pode ser classificado em três tipos: tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco e tecido adiposo bege. O tecido adiposo marrom é composto de adipócitos marrons, caracterizados pela presença de um núcleo central, inúmeras gotículas de lipídios intracelulares e alta concentração de mitocôndrias, sendo capaz de exercer atividade termogênica e de aumento de gasto calórico devido à sua alta taxa de metabolismo. Ele também possui inúmeros tipos celulares de suporte, sendo altamente vascularizado e innervado pelo sistema nervoso simpático (HARMS, SEALE, 2013). Este tipo de tecido é encontrado principalmente em recém-nascidos, localizado nas regiões interescapular e supraclavicular, bem como em torno dos rins, coração, aorta, pâncreas e traqueia (MUNIESA-GONZÁLEZ et al., 2017). A quantidade de tecido adiposo marrom em humanos diminui com o avanço da idade, mas ainda podem ser encontrados em pequenas quantidades na fase adulta (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo bege possui características próximas às do tecido adiposo marrom, apresentando atividades metabólicas similares. Ao contrário do tecido adiposo marrom, o tecido adiposo bege surge principalmente através de estímulos externos, incluindo estimulação da atividade nervosa simpática durante a exposição ao frio, administração de agonistas adrenérgicos ou exercício físico. Sua localização se dá

principalmente entre os depósitos de tecido adiposo branco em localizações anatômicas variadas (WU et al., 2012).

Encontrado em abundância nos seres humanos adultos, o tecido adiposo branco é constituído por adipócitos brancos, que armazenam lipídios intracelulares em um grande vacúolo central, possuindo núcleo periférico e uma menor concentração de mitocôndrias. Outros diferentes tipos celulares além dos adipócitos maduros (fenotipicamente capazes de promover lipogênese) podem ser encontrados no tecido adiposo branco, incluindo macrófagos, células T, fibroblastos, células mesenquimais e vasos sanguíneos (Figura 1) (OUCHI et al., 2011). Os macrófagos presentes no tecido adiposo podem ser encontrados sob duas formas diferentes. No tecido adiposo metabolicamente saudável há um predomínio de macrófagos do tipo M2 (alternativamente ativados), que secretam citocinas anti-inflamatórias. No tecido adiposo disfuncional, predominam os macrófagos M1 (classicamente ativados), que contribuem para um estado inflamatório (LUMENG et al., 2007; COOKE et al., 2016).

Figura 1 – Tecido adiposo com seus principais constituintes.



Desenho representativo de um tecido adiposo, destacando seus principais constituintes. Fonte: Ouchi et al., 2011.

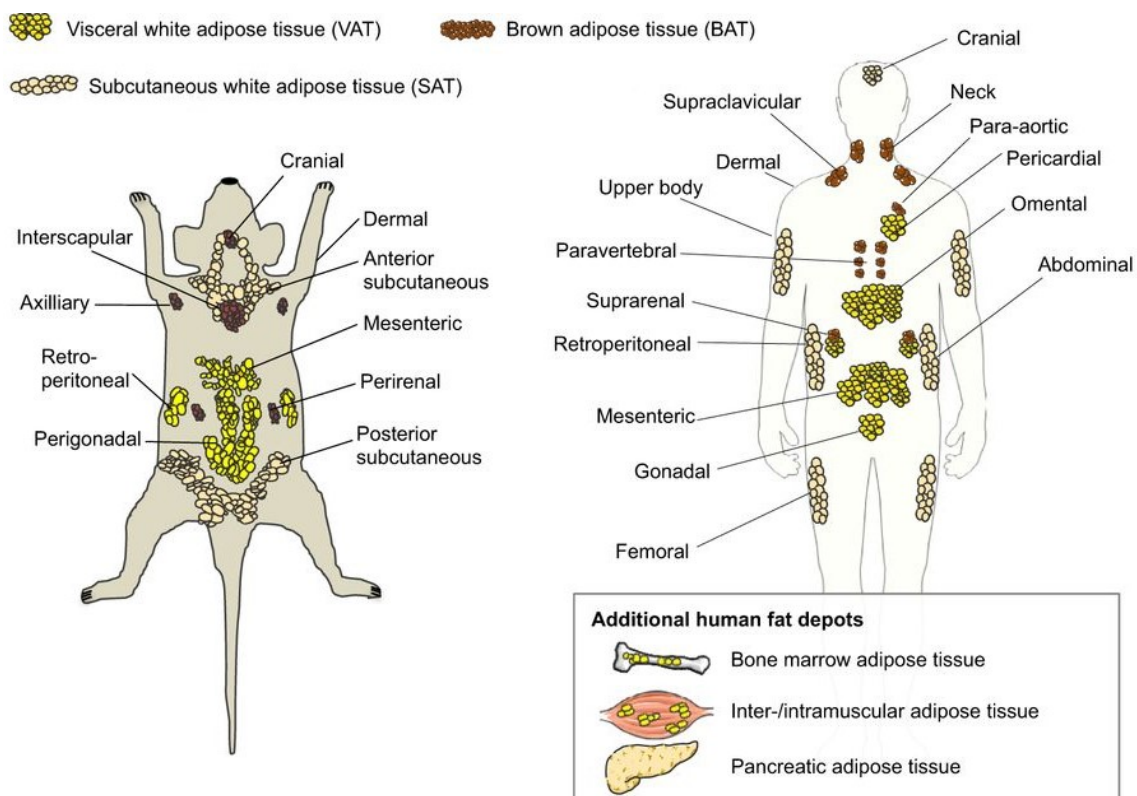
O tecido adiposo branco pode também ser classificado de acordo com sua localização anatômica, em tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral (CHOE et al., 2016). Essa divisão pode determinar a atividade metabólica do tecido e suas funções centrais. Sabe-se que a gordura encontrada em depósitos subcutâneos (abaixo da pele,

região abdominal, glútea e femoral) pode fornecer efeito protetor sobre a homeostasia energética, entretanto, é rica em pré-adipócitos suscetíveis à replicação rápida, o que pode ocasionar um aumento da sua capacidade de tamponamento, contribuindo para a instalação de quadros de lipotoxicidade (deposição ectópica de gordura em outros órgãos). Os depósitos de gordura viscerais, encontrados próximo ou no interior dos órgãos da cavidade abdominal, estão associados ao risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (BERRY et al., 2013; COOKE et al., 2016; KUSMINSKI et al., 2016).

As variações nas localizações anatômicas e características metabólicas de cada tipo de tecido adiposo ocorrem na maioria das espécies de animais, incluindo humanos e camundongos (POND, 1992). Diversas semelhanças tanto na disposição anatômica quanto nas características bioquímicas podem ser observadas entre o tecido adiposo humano e o tecido adiposo murino. Entre estas semelhanças, é possível citar a hipertrofia celular diante de um saldo calórico positivo, levando ao aumento da capacidade do adipócito em armazenar triacilgliceróis (MARTINSON, 1969); uma maior incidência de distúrbios metabólicos frente ao aumento da adiposidade visceral em comparação ao aumento da adiposidade subcutânea (FOX et al., 2007; TRAN, KHAN, 2010); a capacidade de indução termogênica e formação de tecido adiposo bege por exposição ao frio (CARRIÈRE et al., 2014); e a infiltração de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório no tecido adiposo hipertrofiado em resposta à disfunção e necrose de adipócitos (CINTI et al., 2005).

Anatomicamente, a localização dos diferentes tipos de tecido adiposo apresentam semelhanças mas também diferenças entre humanos e camundongos (Figura 2). Como semelhanças, pode-se citar a presença de tecido adiposo visceral nas regiões mesentérica e retroperitoneal em ambas as espécies; já como diferenças, a presença de tecido adiposo subcutâneo na região abdominal de humanos, mas não de camundongos (SCHOETTL et al., 2018).

Figura 2 – Distribuição do tecido adiposo em camundongos e em humanos.



Distribuição do tecido adiposo branco subcutâneo (SAT), tecido adiposo branco visceral (VAT) e tecido adiposo marrom (BAT) em camundongos e em humanos. Fonte: adaptado de SCHOETTL et al., 2018.

2.3 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

A inflamação de baixo grau já foi extensivamente associada à obesidade (TRAYHURN et al, 2004; BASTARD et al., 2006; FAIN, 2006; GALIC et al., 2010; ODEGAARD, CHAWLA, 2012; LILJA et al., 2013). A obesidade resulta em um estado de inflamação crônica de baixo grau chamado de metainflamação (Figura 3), envolvendo interações entre o tecido adiposo, hepático, muscular e cerebral e o sistema imunológico. Diferentemente da inflamação aguda, na qual há extensa produção hepática de proteínas de fase aguda, a inflamação crônica da obesidade é mediada principalmente pelos diferentes tipos celulares que residem no tecido adiposo. Indivíduos obesos apresentam concentrações aumentadas de citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (INF- γ) (GREGOR et al., 2011; ZHANG et al., 2018) e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (CHYLIKOVA et al., 2018). Há uma correlação positiva entre o grau de

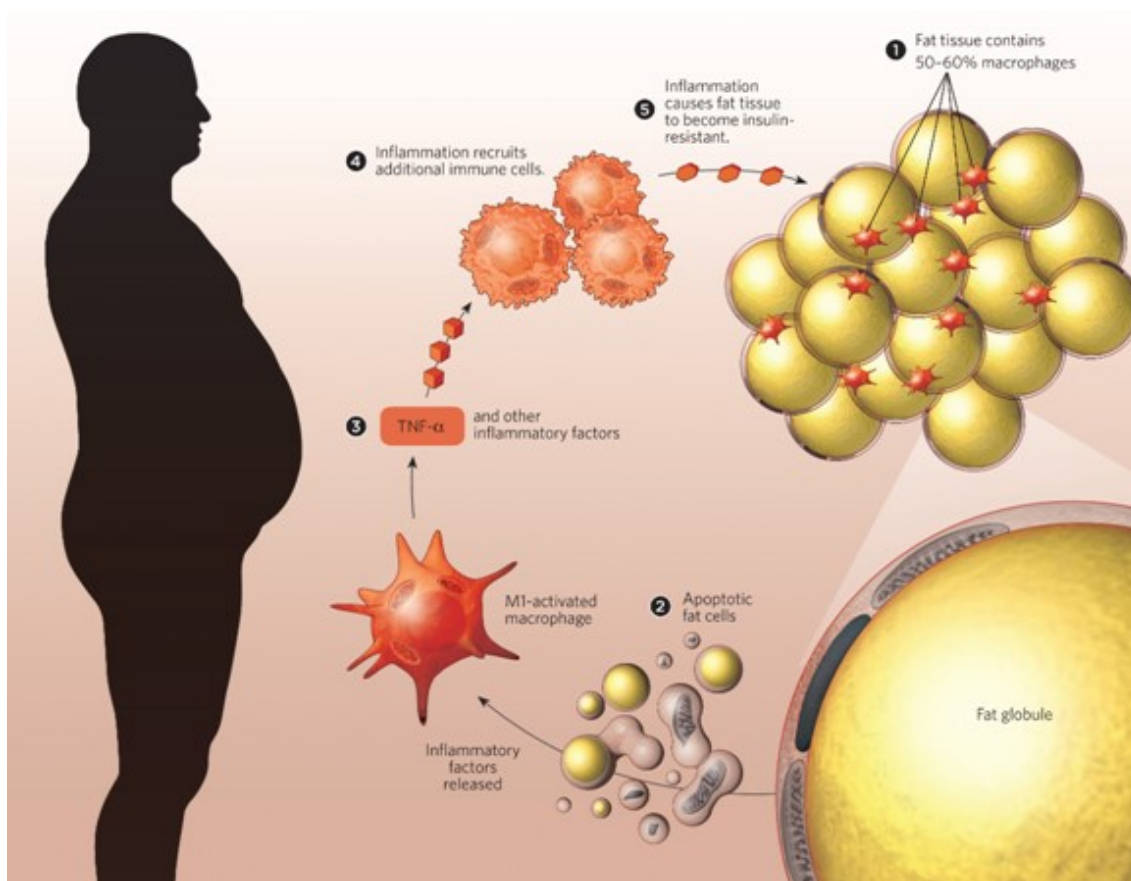
obesidade e as concentrações séricas de TNF- α (ORIHUELA et al., 2017) e a perda de peso em indivíduos obesos geralmente vêm acompanhada de uma redução dessas concentrações (KERN et al., 1995). Além disto, o excesso de adiposidade visceral também leva a um aumento da concentração de interleucina-4 (IL-4), propiciando quadros de alergia (ZHANG et al., 2018). Simultaneamente, citocinas antiinflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) se encontram diminuídas na obesidade, agravando o quadro de inflamação crônica (ESPOSITO et al., 2003). Em camundongos, padrões semelhantes de modificações da expressão gênica de citocinas e adipocinas e de suas concentrações séricas provocadas pela obesidade também podem ser observadas (KANDA et al., 2006; JAIN, BIRD, 2010; LIU et al., 2012; PFALZER et al., 2018).

As adipocinas são citocinas secretadas pelos adipócitos (CONDE et al., 1994). Algumas citocinas clássicas, como IL-6, também são capazes de atuar como adipocinas quando são secretadas e atuam nos próprios adipócitos (MONZILLO, 2003). A leptina, a primeira adipocina a ser descoberta, possui importante papel de mediação pró-inflamatória no tecido adiposo. Em indivíduos obesos, a expressão gênica do mRNA da leptina no tecido adiposo visceral (TSIOTRA et al., 2018), bem como a concentração sérica da adipocina, se encontram elevadas, concomitantemente à elevação das concentrações de citocinas inflamatórias (ZHANG, 2018); em contraste, adiponectina, a adipocina de maior concentração circulante, importante na manutenção da sensibilidade à insulina, se encontra diminuída nestes indivíduos, devido ao *feedback* negativo provocado pelo TNF- α (FANTUZZI, 2005). O TNF- α por sua vez pode ser secretado não apenas por células do sistema imunológico, mas também pelos próprios adipócitos disfuncionais, sendo capaz de contribuir para a resistência à insulina dentro do próprio tecido adiposo (POPKO et al., 2010; GREGOR, HOTAMISLIGIL, 2011). Assim, na metainflamação provocada pela obesidade, o TNF- α também atua como uma adipocina.

A hipertrofia excessiva do tecido adiposo leva à infiltração deste tecido por linfócitos T pró-inflamatórios, capazes de iniciar o processo de metainflamação através de diferentes mecanismos, incluindo o aumento da produção de INF- γ por estas células (KINTSCHER et al., 2008, CALDERON et al., 2008). A liberação de citocinas e adipocinas por este tecido, por sua vez, leva ao recrutamento de macrófagos para dentro do tecido e à polarização do fenótipo desses macrófagos do tipo M2 (alternativamente ativados), com produção predominante de citocinas antiinflamatórias, para o fenótipo M1 (classicamente ativados), com produção predominante de citocinas pró-inflamatórias (ODEGAARD, CHAWLA, 2012). Neste contexto, a citocina MCP-1 apresenta um papel

importante neste recrutamento de macrófagos, sendo fundamental para este processo (KANDA et al., 2006). Assim, a metainflamação provocada pela obesidade é capaz de perpetuar a disfunção do tecido adiposo e do metabolismo (PAULS et al., 2018). Um exemplo desta disfunção é o desencadeamento da resistência à insulina por meio da elevação da concentração da proteína amiloide sérica A (SAA). Esta elevação da concentração de SAA, que em cenários de inflamação aguda ocorre pelo aumento de sua produção hepática, também pode ocorrer como consequência de sua produção pelo tecido adiposo na metainflamação decorrente da obesidade (FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012; JAHANGIRI et al., 2013).

Figura 3 – Relação entre obesidade e inflamação.



Desenho representativo do ciclo de inflamação que ocorre na obesidade. O tecido adiposo hipertrofiado libera citocinas pró-inflamatórias, ativando macrófagos residentes, que liberam mais citocinas e recrutam mais células do sistema imune, levando à inflamação e resistência à insulina nos adipócitos. Fonte: ODEGAARD, CHAWLA, 2012.

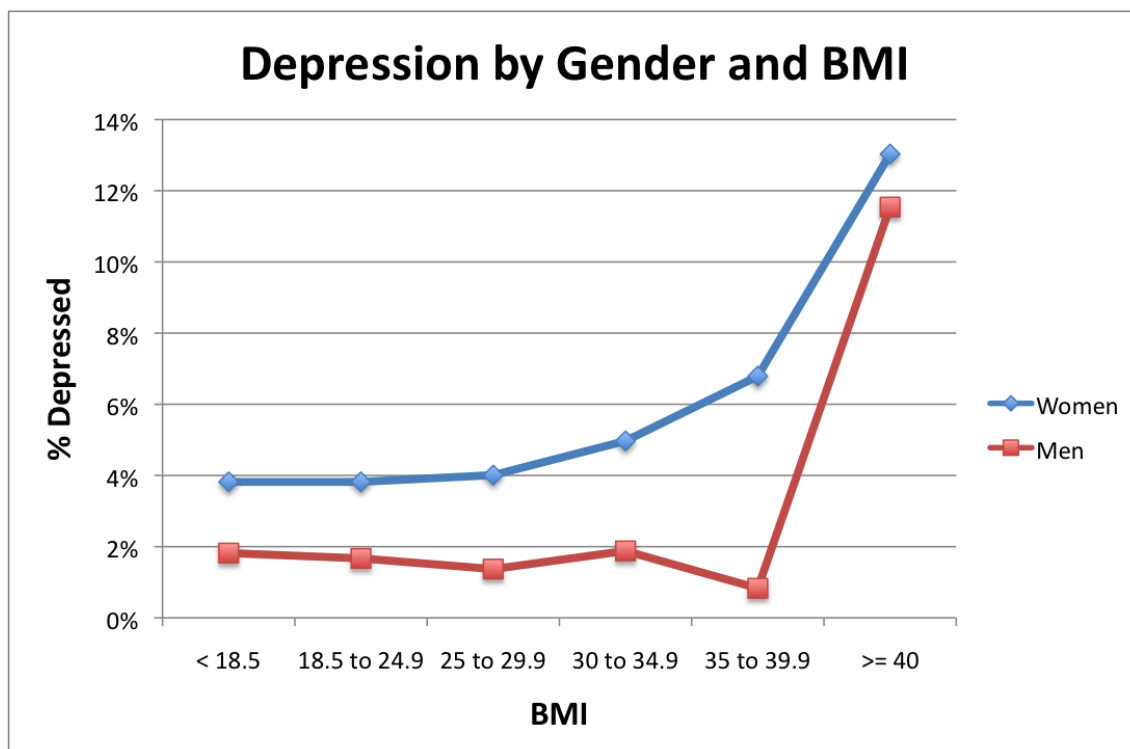
2.4 OBESIDADE E DEPRESSÃO

Uma das possíveis comorbidades da obesidade é a depressão. A depressão é um termo abrangente que pode se referir a um grupo de diferentes transtornos neuropsiquiátricos, incluindo transtorno de depressão maior, distímia e transtorno afetivo sazonal, todos caracterizados por episódios depressivos. Os indivíduos afetados podem demonstrar uma variedade de sintomas, como humor deprimido, perda de motivação, alteração dos padrões de sono, energia reduzida e pensamentos e ideias suicidas. A frequência, padrão e intensidade dos sintomas variam de acordo com o tipo específico de transtorno (APA, 2013).

Indivíduos obesos demonstram uma maior incidência de depressão quando comparados à população geral (Figura 4), mesmo após ajuste pela idade, pelo grau de escolaridade, estado civil e outros possíveis interferentes, como abuso de substâncias psicoativas. Esta diferença na incidência de depressão se torna ainda mais evidente em indivíduos com obesidade mórbida, apresentando uma relação direta com o grau de obesidade em mulheres, e uma associação positiva com a obesidade mórbida, mas não o sobrepeso, em homens (ONYIKE et al., 2003). No entanto, esta relação é complexa e multifatorial, podendo a obesidade induzir quadros depressivos tanto na presença quanto na ausência de consequências metabólicas adversas (TYRRELL et al., 2018).

Diversos mecanismos pelos quais a obesidade apresenta uma possível relação causal com a depressão já foram propostos. Entre eles estão o prejuízo geral à saúde e à funcionalidade inerentes ao estado de obesidade, questões de autoestima e imagem corporal (MARKOWITS et al., 2008), modificações bioquímicas como as interações de adiponectina, leptina, grelina e endocanabinóides com receptores celulares no tecido cerebral (GONG et al., 2013) e alterações homeostáticas como ajustes no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (MILANESCHI et al., 2018).

Figura 4 – Relação entre IMC e depressão.



Associação da incidência de depressão (eixo vertical) com o índice de massa corporal (eixo horizontal) em indivíduos do sexo feminino (linha azul) e masculino (linha vermelha). Fonte: ONYIKE et al., 2003.

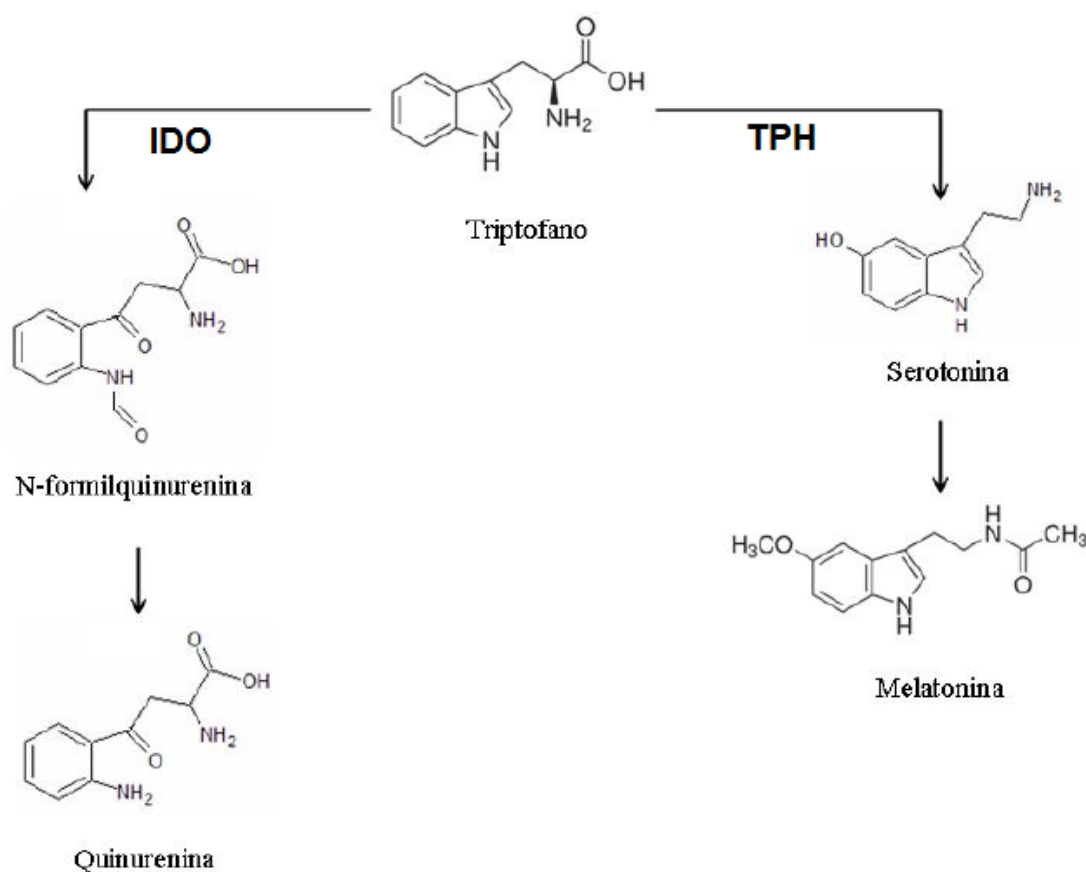
2.5 METABOLISMO DO TRIPTOFANO

O aminoácido L-triptofano é um aminoácido essencial para todos os mamíferos. Uma das funções importantes do triptofano é sua participação na síntese de proteínas. Nos seres humanos, cerca de 1.2% do peso proteico é composto por este aminoácido (MAHAN, SHIELDS, 1998). O percentual do triptofano oriundo da dieta que é direcionado à síntese proteica varia conforme o estado fisiológico, idade e disponibilidade nutricional, com um maior suprimento de triptofano levando a uma maior proporção de seu catabolismo por vias não-proteicas. Como consequência do equilíbrio entre síntese e degradação proteica em humanos adultos saudáveis, o saldo do metabolismo proteico do triptofano é quase zero nestes indivíduos (SAWADOGO et al., 1997). Assim, o triptofano obtido da dieta, cuja recomendação nutricional se dá em torno de 350 a 400 mg por dia (LAZARIS-BRUNNER et al., 1998), é principalmente metabolizado pelo catabolismo não-proteico. Cerca de 90% a 95% deste catabolismo ocorre pela via das quinureninas,

enquanto apenas 1% do triptofano é utilizado para síntese de serotonina, catalisada pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) (WOLF, 1974; BADAUWY, 2017) (Figura 5).

O triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina e em alguns distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão, costumam acompanhar perturbações nesta via metabólica, podendo estar relacionados à redução da disponibilidade deste aminoácido (HUGHES et al., 2012; JENKINS et al., 2016; SAMAD et al., 2019). Evidências mostram que esta redução pode ocorrer como consequência de uma ativação inflamatória (MAES, 1999). A enzima IDO desempenha um papel importante no desenvolvimento da depressão frente a quadros de inflamação sistêmica, como, por exemplo, na inflamação induzida pelo tratamento com INF- α em pacientes com hepatite C (BONACCORSO et al., 2002).

Figura 5 – Vias metabólicas do L-triptofano.



Esquema simplificado das principais vias metabólicas do aminoácido L-triptofano, com as respectivas enzimas que catalisam as etapas fundamentais de cada via. À esquerda: a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) catalisa a etapa limitante da via das quinureninas; à direita, a enzima triptofano hidroxilase (TPH) catalisa a etapa limitante da síntese de serotonina. Fonte: elaborado pelo autor.

2.6 A VIA DAS QUINURENINAS

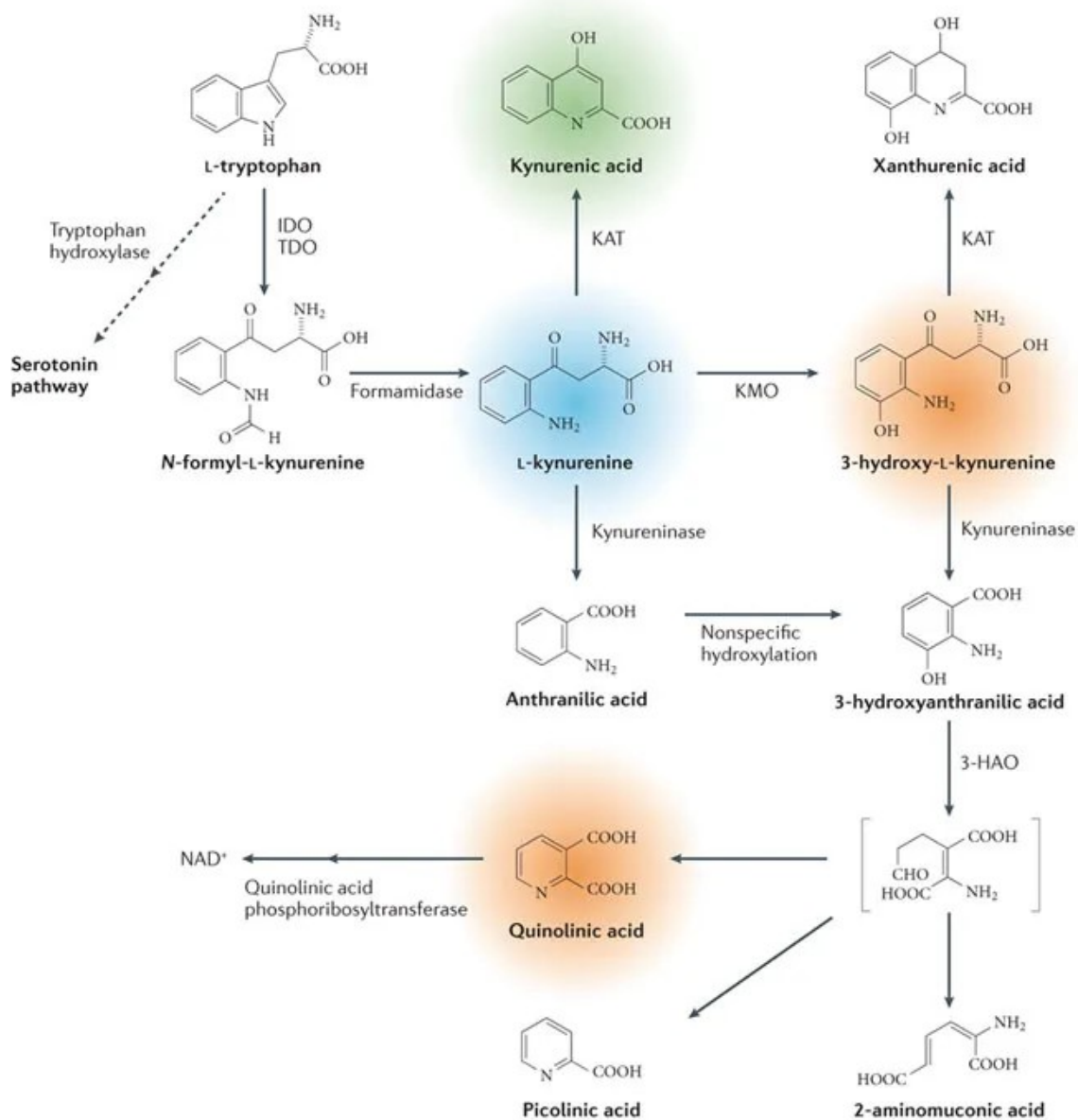
A IDO (EC 1.13.11.52) é uma enzima codificada pelo gene *IDO1*, que em humanos e camundongos se localiza-se no cromossomo 8, no *locus* 8p12-->p11 (NAJFELD et al., 1993), com homologia de 61% entre estas duas espécies (AKEMI et al., 1991). É uma hemoproteína monomérica de cerca de 45 kDa localizada no citoplasma (SUGIMOTO et al., 2006) que catalisa a etapa limitante do metabolismo não-proteico do triptofano pela via das quinureninas, formando o composto intermediário N-formilquinurenina ao usar um ânion superóxido como doador de oxigênio (HAYASHI, 1996). Sendo expressa majoritariamente nas células do sistema imunológico e em tecidos como o pulmão, intestino delgado, baço, nódulos linfáticos, cérebro e tecido adiposo (YAMAZAKI et al., 1985; UHLEN et al., 2015; THUL et al., 2017). A IDO é amplamente descrita por desempenhar papéis em diversos processos fisiopatológicos, incluindo defesa antimicrobiana (HONG et al., 2016), resistência tumoral (TOURINO et al., 2013), neuropatologias (BONDA et al., 2010) e regulação imunológica (KOIVULA et al., 2017). A atividade da IDO é aumentada por uma série de estímulos inflamatórios, incluindo as citocinas INF- γ e TNF- α , que são capazes de aumentar não apenas a atividade, mas também a expressão gênica da enzima (O'CONNOR et al., 2009).

Por ser uma via metabólica majoritária do metabolismo não-proteico do triptofano, a via das quinureninas resulta na produção de diversos compostos neuroativos, alguns dos quais demonstram propriedades neurotóxicas. A L-quinurenina é o primeiro composto estável desta via (BENDER et al., 1982) e juntamente com alguns de seus metabólitos, é capaz de induzir diversos distúrbios neuropsiquiátricos, como déficit cognitivo e depressão (SWARDFAGER et al., 2009).

Quase todos os metabólitos da via das quinureninas possuem alguma atividade neurológica, mas o ácido quinurênico, a 3-hidroxi-L-quinurenina e o ácido quinolínico são os que apresentam neuroatividade mais relevante. A 3-hidroxi-L-quinurenina e o ácido quinolínico induzem neurotoxicidade por agonismo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e produção de espécies reativas de oxigênio. Em contraste, o ácido quinurênico exerce atividade neuroprotetora por sua atuação como antagonista glutamatérgico e captador de espécies reativas de oxigênio. O ácido quinurênico é sintetizado diretamente da quinurenina em astrócitos e neurônios por transaminação irreversível, enquanto a 3-hidroxi-L-quinurenina e o ácido quinolínico são sintetizados

predominantemente por macrófagos infiltrados e pela microglia, estando associados aos efeitos neurodegenerativos observados na ativação exacerbada da via das quinureninas (VÉCSEI et al., 2013) (Figura 6).

Figura 6 – Via das quinureninas.



Representação esquemática da via das quinureninas, cuja etapa limitante é catalisada pela enzima IDO e, secundariamente, pela enzima TDO. O primeiro metabólito estável, a quinurenina, está destacado em azul. Seus metabólitos secundários mais relevantes estão destacados em verde (ácido quinurênico) e laranja (3-hidroxi-L-quinurenina e ácido quinolínico). Fonte: VÉCSEI et al., 2013.

Já foi demonstrado em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa que pacientes obesos pré-cirurgia bariátrica apresentam simultaneamente maior atividade

inflamatória sistêmica, maior atividade da enzima IDO e uso elevado de medicamentos psicotrópicos relacionados à distúrbios neuropsiquiátricos, principalmente depressivos, e que há uma correlação entre estes três fatores, havendo uma tendência na diminuição simultaneamente após a redução de peso e do IMC consequentes da cirurgia bariátrica. Também foi demonstrado que as concentrações séricas de triptofano são menores nestes pacientes do que em indivíduos de IMC dentro da faixa de normalidade, sugerindo que a atividade da IDO aumentada em relação ao valor basal nos pacientes obesos leva não somente ao aumento de quinurenina e outros metabólitos neurotóxicos, mas também à redução da disponibilidade de triptofano. Com isto, sugere-se uma correlação entre obesidade, inflamação, atividade da IDO e depressão (CARMO et al., 2017).

2.7 ADIPOGÊNESE

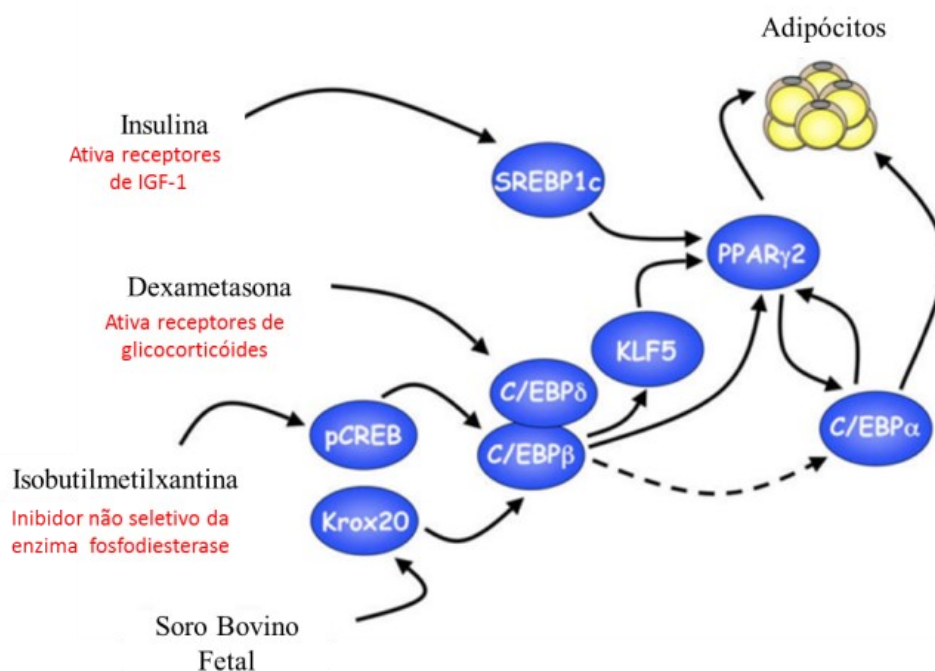
A adipogênese, que consiste na formação de novos adipócitos a partir de células precursoras multipotentes, pode ocorrer em qualquer etapa da vida do indivíduo, seja em resposta ao *turnover* celular ou à necessidade adicional de armazenamento de gordura consequente da ingestão de excesso calórico (AVRAM et al., 2007). As células mesenquimais precursoras dos adipócitos, semelhantes a fibroblastos, são convertidas em pré-adipócitos que não podem ser distinguidos morfológicamente das células mesenquimais, mas que não possuem mais a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares. O pré-adipócito passa a expressar diversos fatores de transcrição que induzem a sua diferenciação em adipócitos (ARMANI et al., 2010; ROSEN et al., 2006). Dentre estes fatores, encontram-se o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), considerado o regulador central do processo de adipogênese e a família de proteínas ligadas ao amplificador CAAT, os C/EBPs (C/EBP- α , C/EBP- β e C/EBP- δ) (FARMER, 2006; ROSEN et al., 2006; LEFTEROVA, LAZAR, 2009) (Figura 7). Diversos estudos *in vitro* têm explorado os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de adipogênese (MOON et al., 2007; GUO et al., 2009; FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012; CEPPO et al., 2014).

A linhagem celular 3T3-L1, originalmente estabelecida por Green e Kehinde (1975), pode facilitar os conhecimentos sobre os mecanismos que regulam a adipogênese. As células desta linhagem de pré-adipócitos murinos são capazes de se diferenciar em adipócitos maduros, ao atingirem confluência na monocamada de células em cultura e serem expostos a um coquetel adipogênico, que se constitui de meio de cultura

suplementado com soro fetal bovino (SFB), insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina (IBMX). A insulina atua na ativação de receptores do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1); a dexametasona é capaz de ativar receptores de glicocorticoides; a IBMX atua como inibidor não seletivo da enzima fosfodiesterase. Este coquetel é conhecido como “meio de indução”, ou MDI (NTAMBI; KIM, 2000; ZEBISCH et al., 2012).

As células estimuladas com MDI progridem no ciclo celular, realizando dois ciclos de expansão clonal. Nesta etapa ocorre a expressão dos fatores de transcrição C/EBP- β e C/EBP- δ . A presença de IBMX aumenta a expressão de C/EBP- β por sinalização de AMP cíclico. O C/EBP- β e a dexametasona (um glicocorticóide) induzem a expressão de C/EBP- δ (FARMER, 2005; WU et al., 1996). Juntos, estes fatores de transcrição levam à expressão de PPAR γ 2 e C/EBP- α , cujo *feedback* propicia a manutenção de sua própria expressão, atuando na indução da transcrição de centenas de genes até então silenciados que são necessários à geração e manutenção do fenótipo de adipócitos maduros – células com o maquinário necessário ao transporte de lipídios (proteínas ligantes de ácidos graxos, proteínas transportadoras de ácidos graxos), à sensibilidade à insulina (receptor de insulina, receptor de glicose Glut4) e à secreção de proteínas específicas dos adipócitos (ROSEN et al., 2006). A diferenciação terminal em adipócito maduro é manifestada, além das características bioquímicas, pela alteração morfológica das células adipocíticas para um formato esférico e pelo acúmulo de lipídios no seu citoplasma (FARMER, 2006; LEFTEROVA, LAZAR, 2009; ZEBISCH et al., 2012).

Figura 7 – Genes envolvidos na adipogênese.



Fatores de transcrição e genes envolvidos na adipogênese mediada por estímulo hormonal. Estes suplementos são capazes de ativar fatores de transcrição específicos que resultam na ativação de PPAR γ 2 e C/EBP α , levando à diferenciação terminal das células em adipócitos maduros. Fonte: adaptado de Farmer, 2006.

2.8 ESTUDOS *IN VITRO*

Ensaio biológico *in vitro* possuem diversas vantagens em relação aos ensaios *in vivo*. Estes estudos permitem análises mais simples e mais convenientes em relação aos estudos *in vivo*, permitindo que mecanismos específicos sejam estudados mais detalhadamente, facilitando a pesquisa no que diz respeito ao número de componentes e variáveis (VIGNAIS et al., 2010). Por exemplo, a natureza das proteínas envolvidas na resposta imunológica e os mecanismos pelos quais elas reconhecem e se ligam aos antígenos não poderia ser elucidada sem um extensivo uso de estudos *in vitro* capazes de isolar estas proteínas, identificar sua origem celular e transcricional, avaliar as propriedades físicas de suas interações com antígenos e identificar como estas interações conduzem a sinalizações celulares capazes de ativar respostas imunológicas (NAIRN et al., 2009). Por outro lado, a maior desvantagem dos sistemas *in vitro* consiste na dificuldade em se extrapolar seus resultados ao organismo humano, fazendo-se necessária

cautela para evitar interpretações errôneas que podem levar a conclusões equivocadas sobre a biologia de sistemas orgânicos (ROTHMAN, 2002).

Na tentativa de mitigar as limitações dos estudos *in vitro* sem abrir mão de suas vantagens, tem-se utilizado modelos de co-cultura, nos quais mais de um tipo ou linhagem celular são cultivados em conjunto, com o objetivo de melhor mimetizar os tecidos biológicos e as interações entre diferentes tipos celulares em um mesmo tecido (YAO et al., 2020). Modelos de co-cultura já foram estabelecidos para mimetizar tecido cartilaginoso (ZHANG et al., 2019), barreira hematoencefálica (IDRIS et al., 2019) e tecido adiposo (PRYADARSHINI et al., 2018). Este cenário encoraja o uso de co-culturas para a realização de ensaios biológicos, incluindo a co-cultura de macrófagos e adipócitos para a mimetização do tecido adiposo.

2.9 ESTUDOS *EX VIVO*

Os estudos *ex vivo* podem ser considerados como um intermediário entre os estudos *in vitro* típicos, de monocultura celular, e os estudos *in vivo* (CLIFT et al., 2011). Neste modelo, o tecido é extraído inteiro e cultivado em laboratório em condições próximas às dos estudos *in vitro*, o que mantém a arquitetura celular e relações bioquímicas entre as células que compõem o tecido. Ensaios *ex vivo* podem ser aplicados, por exemplo, no estudo de substâncias corrosivas à córnea utilizando-se córneas bovinas extraídas dos animais.

Os modelos *ex vivo* são eticamente vantajosos, uma vez que não requerem cuidados pós-cirúrgicos e utilizam um menor número de animais. Estes estudos permitem uma maior reprodutibilidade de resultados e criam um ambiente de maior controle de variáveis em relação aos estudos *in vivo*. Neste contexto, ensaios *ex vivo* apresentam uma abordagem parecida com a da utilização *in vitro* de co-culturas celulares (WANG et al., 2015; DUSINSKA et al, 2017).

Diante do exposto, foi desenvolvido um modelo de co-cultura das linhagens murinas 3T3-L1 e J774 a fim de mimetizar *in vitro* o comportamento bioquímico de um tecido adiposo, com o objetivo de avaliar a atividade da enzimaIDO e a via metabólica das quinureninas neste tecido frente a estímulos inflamatórios. Também foi utilizado tecido adiposo murino *ex vivo* para dar complementaridade a esta avaliação.

OBJETIVOS

2.10 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel do tecido adiposo no metabolismo do triptofano a partir da via das quinureninas em um modelo de co-cultura celular de adipócitos e macrófagos e em um tecido adiposo *ex vivo* de camundongos.

2.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um modelo de co-cultura de linhagens celulares de adipócitos e macrófagos;
- Caracterizar o modelo de co-cultura quanto ao acúmulo de lipídios e compará-la com o tecido adiposo subcutâneo e visceral (*Mus musculus*) em relação a liberação de adipocinas (leptina e adiponectina);
- Induzir um microambiente de inflamação crônica de baixo grau na co-cultura e no tecido que mimetize a inflamação comum à obesidade, a partir da exposição das amostras à citocina INF- γ ;
- Determinar o perfil de liberação de citocinas e adipocinas em modelo de co-cultura e tecido na presença e ausência de INF- γ ;
- Determinar a atividade da enzima IDO e a expressão do gene desta enzima no modelo de co-cultura e tecido na presença e ausência de INF- γ .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Padrões de triptofano e quinurenina com padrão analítico (pureza > 99%), interferon-gama murino (INF- γ), insulina de pâncreas bovino, corante lipofílico Oil Red O, corante fluorescente Nile Red, dexametasona, dimetilsulfóxido (DMSO) e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água ultrapura foi obtida por Sistema de purificação de água Mili-Q (Millipore, Bedford, EUA). Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alta glicose, soro fetal bovino (SFB), soro de bezerro (CS), penicilina, estreptomicina e ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico (HEPES) foram comprados da Gibco® (Gaithersburg, MD, EUA) para cultivo das linhagens celulares. Todos os demais reagentes e solventes utilizados foram de padrão analítico.

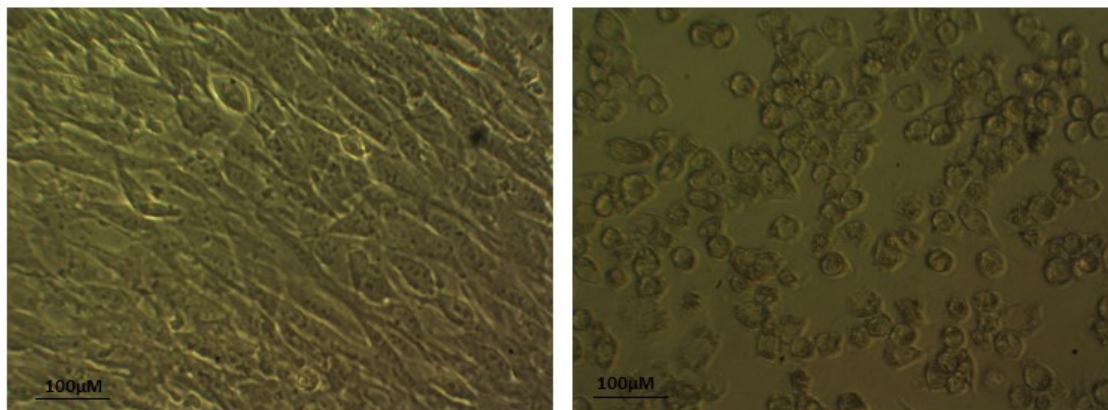
4.2 LINHAGENS CELULARES

Foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™), uma linhagem imortalizada de fibroblasto murino de origem embrionária com capacidade de conversão de fenótipo pré-adipócito para fenótipo adipócito, capaz de expressar receptores de insulina e acumular triglicerídeos intracelulares.

Também foi utilizada a linhagem celular J774 (J774A.1) (ATCC® TIB-67™), uma linhagem imortalizada de monócito/macrófago de origem do líquido ascítico capaz de expressar receptores imunológicos (complemento C3, receptor de imunoglobulina G - IgG) e de produzir continuamente a citocina pró-inflamatória interleucina-1 beta (IL-1 β).

Fotomicrografias destas duas linhagens estão exibidas a seguir (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografias de 3T3-L1 e J774.



Fotomicrografias das linhagens celulares utilizadas. À esquerda: pré-adipócito 3T3-L1 (100% de confluência). À direita: macrófago J774A.1 (70-80% de confluência). Microscopia de campo claro (aumento de 200x). Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

A diferenciação adipogênica procedeu conforme técnica clássica (ROSOLEN et al., 2016). Pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 foram semeados em placas de 24 poços utilizando-se meio de cultura DMEM suplementado com 10% de CS, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES, na densidade de 5×10^4 células por poço, sendo incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 100% de umidade relativa. Aguardou-se 24 horas para confluência dos poços e mais 48 horas para adaptação das células. Em seguida, as células foram tratadas com meio de indução (MDI), constituído de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES, 10 µg/mL de insulina, 110 µg/mL de IBMX e 0,4 µg/mL de dexametasona por 5 dias, com troca do meio no 3º dia. Após este período, as células foram tratadas com meio de manutenção (MM), constituído de DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES, 10 µg/mL de insulina, no qual permaneceram por mais 2 dias para acúmulo intracelular de lipídios.

4.4 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

O *Oil red O* é um corante lipofílico capaz de se ligar aos lipídios intracelulares, podendo ser usado para avaliar qualitativamente o acúmulo destes lipídios através da coloração vermelha que eles adquirem quando observados ao microscópio (KRAUS et al., 2016; VANKONINGSLOO et al., 2006).

A diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1 foi avaliada qualitativamente através da coloração com este corante, por microscopia de campo claro, conforme técnica de Rosolen e colaboradores (2016). Após a etapa de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de formaldeído 3,7% durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foram lavadas 2 vezes com água ultrapura, e coradas com uma mistura de solução de Oil Red O (0,5% em isopropanol) e água ultrapura, na proporção de 2:3, por mais 15 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente 2 vezes com água e em seguida com solução aquosa de isopropanol 50%, sendo então submetidas à visualização em microscópio óptico.

4.5 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE CO-CULTURA

Para estabelecimento do melhor modelo de co-cultura, a diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1 foi realizada conforme descrito no item 4.4, ou na presença de células da linhagem J774, em placas de 24 poços. Na condição de monocultura 3T3 não-diferenciada (Controle -), na condição de monocultura 3T3 diferenciada (Controle +) e em 3 das co-culturas (Co-Cultura 2, Co-Cultura 3 e Co-Cultura 4) foram semeadas 5×10^4 células 3T3-L1. Na Co-cultura 1, foram semeadas $3,4 \times 10^4$ células 3T3-L1 em conjunto com $1,6 \times 10^4$ células J774, devidamente homogeneizadas. Após a confluência total de todos os poços, prosseguiu-se à diferenciação adipogênica do Controle + e das co-culturas. No quarto dia de incubação, quando se adicionou MDI, foram semeadas células J774 na concentração de 3×10^4 células por poço sobre as células 3T3-L1 previamente plaqueadas na Co-Cultura 2. No dia da troca do MDI, fez-se a mesma semeadura de células J774 na Co-Cultura 3, e no dia da substituição do MDI por MM, fez-se a mesma semeadura na Co-Cultura 4.

Desta forma, a variação entre as quatro co-culturas se deu conforme o dia, durante o processo de diferenciação da linhagem 3T3-L1, em que a linhagem J774 foi semeada no poço; além disso, houve semeadura de um menor número de células na Co-Cultura 1,

em consideração à capacidade das células em se reproduzirem durante os primeiros dias do processo de diferenciação. A tabela (Tabela 2) a seguir ilustra como foram feitas as sementeiras conforme o tempo de incubação.

Tabela 2 – Tabela esquemática do estabelecimento de co-cultura.

Controle -	Controle +	Co-C 1	Co-C 2	Co-C 3	Co-C 4
Dia 1 (Plaqueamento)					
+3T3	+3T3	+3T3 +J7	+3T3	+3T3	+3T3
DMEM+CS	DMEM+CS	DMEM+CS	DMEM+CS	DMEM+CS	DMEM+CS
Dia 4 (Adição de MDI)					
3T3	3T3	3T3 J7	3T3 +J7	3T3	3T3
DMEM+CS	MDI	MDI	MDI	MDI	MDI
Dia 7 (Troca de MDI)					
3T3	3T3	3T3 J7	3T3 J7	3T3 +J7	3T3
DMEM+CS	MDI	MDI	MDI	MDI	MDI
Dia 9 (Adição de MM)					
3T3	3T3	3T3 J7	3T3 J7	3T3 J7	3T3 +J7
DMEM+CS	MM	MM	MM	MM	MM
Dia 11 (Análise)					
3T3	3T3	3T3 J7	3T3 J7	3T3 J7	3T3 J7
DMEM+CS	MM	MM	MM	MM	MM

Esquema representativo do plaqueamento para estabelecimento da co-cultura da linhagem murina de adipócitos 3T3-L1 com a linhagem murina de macrófagos J774, conforme os dias de incubação. Co-C: co-cultura.

4.6 ANÁLISE DA LIPOGÊNESE DOS MODELOS DE CO-CULTURA

O acúmulo de lipídios intracelulares nos modelos de co-cultura foi avaliado quantitativamente através da técnica de citometria de fluxo, usando o corante lipofílico e fluorescente *Nile Red*® (NR). O NR é um corante seletivo para lipídeos intracelulares, capaz de emitir fluorescência na faixa de comprimento de onda de 528 a 570 nm (ALDRIDGE et al., 2013). Esta fluorescência ocorre preferencialmente em ambiente lipofílico, levando ao aumento da intensidade de emissão quando há a presença de lipídios (PEREIRA-FERNANDES et al., 2013).

Para a realização desta metodologia, seguiu-se o protocolo descrito por Shu-Hui e colaboradores (2013). As células de cada condição foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS), ressuspendidas por ação enzimática (tripsina) e centrifugadas por 5 min a 180 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi fixado com formaldeído 2 % por 20 min a temperatura ambiente. Após mais uma lavagem com PBS, centrifugou-se novamente e adicionou-se 5 µg/mL de NR por 30 minutos, protegido da luz. Foi feita nova lavagem seguida de centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi suspenso com 200 µL de PBS e o conteúdo foi transferido para tubos de citometria. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACS CANTO II, BD Biosciences. As populações de células foram analisadas por dot plots e histogramas com o auxílio do software Flowing 2.5. Células Nile Red negativas foram consideradas como “negativas para lipídios intracelulares”, enquanto células Nile Red positivas foram consideradas como “positivas para lipídios intracelulares”.

4.7 ESTÍMULO INFLAMATÓRIO COM INF- γ

Para determinação da influência do INF- γ sobre diferentes parâmetros *in vitro*, foi escolhido o modelo de co-cultura em que foram semeadas $3,4 \times 10^4$ células 3T3-L1 em conjunto com $1,6 \times 10^4$ células J774. Este modelo foi submetido à diferenciação adipogênica com MDI, conforme descrito anteriormente. Paralelamente, células 3T3-L1 isoladas também foram submetidas à diferenciação. No sétimo dia, metade das células de cada grupo foi tratada com 20 ng/mL de INF- γ por 48 horas, conforme descrito por Holická e colaboradores (2009) com modificações, enquanto a outra metade de cada grupo permaneceu sem adição de interferon. No nono dia, as células e o sobrenadante celular foram submetidos a análises posteriores.

4.8 OBTENÇÃO DE TECIDO ADIPOSEO *EX VIVO*

Com o intuito de comparar o perfil de liberação de citocinas e adipocinas das linhagens celulares com o de um tecido adiposo, bem como realizar ensaio de expressão do gene IDO1, foram obtidas amostras de tecido adiposo *ex vivo* de camundongos Swiss machos (CEUA/UFSC PP00892).

Cinco camundongos saudáveis foram eutanasiados com overdose de cetamina (anestésico dissociativo) e xilazina (agonista de receptores α -2 adrenérgicos) conforme técnica descrita no Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (BRASIL-CONCEA, 2018), e tiveram amostras de tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral excisadas com bisturi e pinça. As amostras de tecido adiposo subcutâneo foram separadas das de tecido adiposo visceral, e cada amostra foi submetida à incubação por 48 horas com meio de cultura DMEM, suplementado com penicilina, estreptomicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciprofloxacino e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina-B. Metade das amostras foi tratada com 20 ng/mL de $\text{INF-}\gamma$. A tabela a seguir ilustra como foram divididas as amostras (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela esquemática do tratamento do tecido adiposo *ex vivo*.

Subcutâneo + DMEM	Visceral + DMEM
Subcutâneo + DMEM + $\text{INF-}\gamma$	Visceral + DMEM + $\text{INF-}\gamma$

Esquema representativo dos tratamentos das amostras de tecido adiposo murino *ex vivo*. Todas as amostras foram incubadas por 48 horas antes das análises.

4.9 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E ADIPOCINAS SOB ESTÍMULO COM $\text{INF-}\gamma$

As concentrações das citocinas $\text{TNF-}\alpha$, interleucina-4 (IL-4), IL-6 e interleucina-10 (IL-10), bem como das adipocinas leptina e adiponectina, foram determinadas nos sobrenadantes das células da co-cultura, das células 3T3-L1 isoladas e das amostras de tecido adiposo *ex vivo* incubadas em meio de cultura. Para esta medição foram utilizados kits de imunoensaio enzimático (ELISA) do tipo sanduíche, fabricados pela MyBioSource (San Diego, Califórnia, EUA). As análises se deram de acordo com os

protocolos fornecidos pelo fabricante. As concentrações foram determinadas por interpolação em curvas de calibração. A sensibilidade do método foi de 4 pg/ mL para TNF- α , 1 pg/ mL para IL-4, IL-6 e IL-10, e 0,1 pg/ mL para leptina e adiponectina.

4.10 ATIVIDADE DA ENZIMA IDO *IN VITRO*

As concentrações de triptofano e quinurenina nos sobrenadantes das células da cocultura e das células 3T3-L1 isoladas, incubadas na presença ou ausência de estímulo inflamatório com 20 ng/mL de INF- γ , foram medidas por HPLC de fase reversa (Shimadzu LC-20A, Shimadzu Corporation), de acordo com métodos previamente descritos (OZKAN et al., 2014; XIAO et al., 2014; VIGNAU et al., 2004; MUNIPALLY et al., 2011; KRCMOVA et al., 2011), com modificações. Foi utilizada uma coluna C8 (150 x 4.60 mm, 4 μ m, 80A) em um gradiente de duas bombas, fornecendo as fases móveis A e B; a fase móvel foi constituída de acetonitrila e a fase móvel B foi constituída de água. Foi utilizado um controlador de sistema SCL-10A VIP, injetor automático SIL-10AF com bombas LC-10A VP e degassificador DGV-14A. O tempo de corrida foi 20 minutos, à uma taxa de fluxo de fase móvel de 0,5 mL por minuto. Os compostos foram detectados por detectores de arranjo de diodo SPDM 10A VP em comprimento de onda 280 nm para o triptofano e 365 nm para a quinurenina. A área sob a curva de cada composto foi obtida com software Class-CP (Shimadzu), e a concentração de cada composto foi determinada a partir da área sob a curva.

4.11 EXPRESSÃO DO GENE IDO1 NO TECIDO ADIPOSEO *EX VIVO*

4.11.1 Extração de RNA total

Após os tratamentos com meio de cultura e INF- γ , as amostras de tecido adiposo de camundongo foram maceradas na presença de TRIZOL® (Gibco®) para liberação do RNA total, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, foi adicionado clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente, incubadas em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 14.000 x g (4 °C). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo no qual adicionou-se álcool isopropílico, seguido de incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 x g e removeu-se o sobrenadante. O sedimento contendo o RNA total foi lavado com

etanol 75 % e novamente centrifugado por 5 minutos a 7.500 x g (4 °C). O sobrenadante foi removido, o sedimento foi seco em temperatura ambiente e redissolvido em água livre de RNase. A seguir, foi realizada a quantificação do RNA extraído com o espectrofotômetro Nano Vue® (GE Healthcare), e sua pureza foi avaliada em comprimento de onda de 260/280 e 260/230. As amostras foram então tratadas com DNase I (Invitrogen™), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

4.11.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit High – Capacityc DNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 °C até sua utilização para a reação de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). As incubações foram realizadas em termociclador Biocycler (BioSystems).

4.11.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

A expressão do gene IDO1 murino foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR), utilizando GAPDH murino como controle endógeno (Tabela 4). Utilizou-se o Thermofischer Scientific TaqMan/ qPCR Master Mix conforme indicações do fabricante. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystem). Para todos os experimentos o limiar de amplificação (Ct) foi determinado automaticamente pelo software 7500 Fast System SDS 2.4 (AppliedBiosystem). A eficiência da amplificação foi calculada utilizando-se o Software LinRegPCR, que calcula a eficiência das reações através de uma regressão linear da curva de amplificação. Considerou-se uma reação eficiente quando o valor de amplificação ficou entre 1.8 e 2.0.

Tabela 4 – Primers utilizados na metodologia de qPCR.

Primer (murino)	Sequência
IDO1 Forward	AAAGGCACTGCACGACATAGC
IDO1 Reverse	TCCCAGACCCCCTCATACAG
GAPDH Forward	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
GAPDH Reverse	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

Sequências de bases nitrogenadas dos primers do gene IDO1 murino e GAPDH murino, utilizados na quantificação por método de qPCR.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CURVAS DE CALIBRAÇÃO

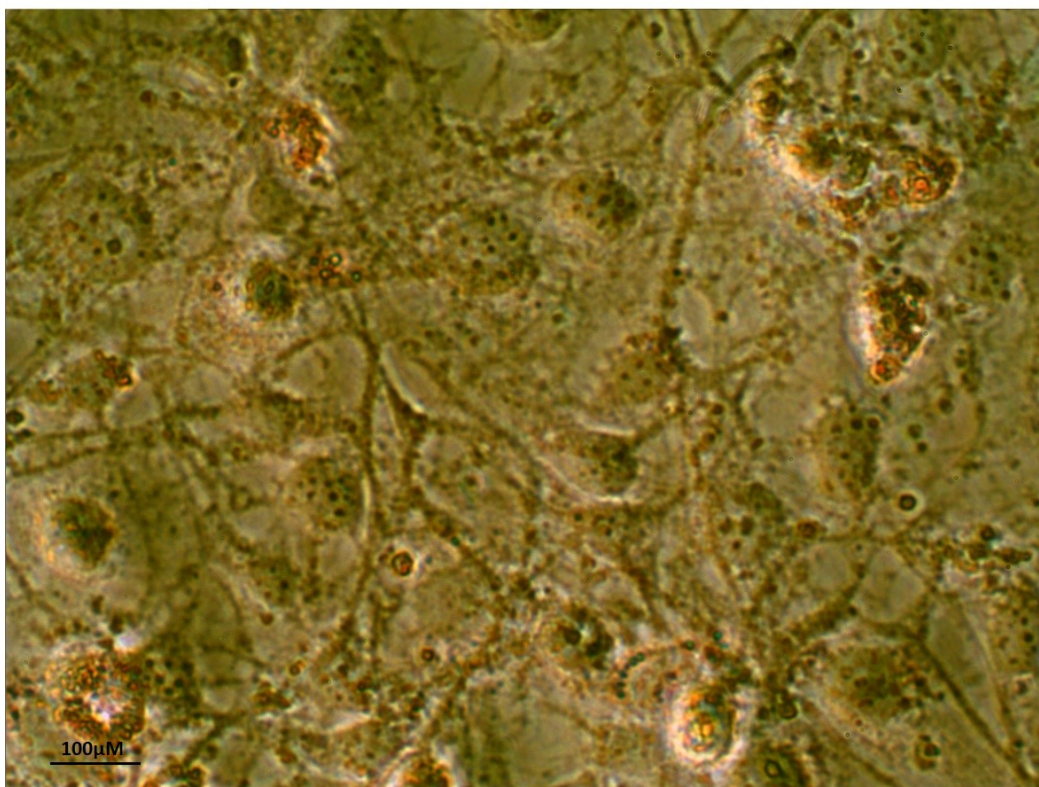
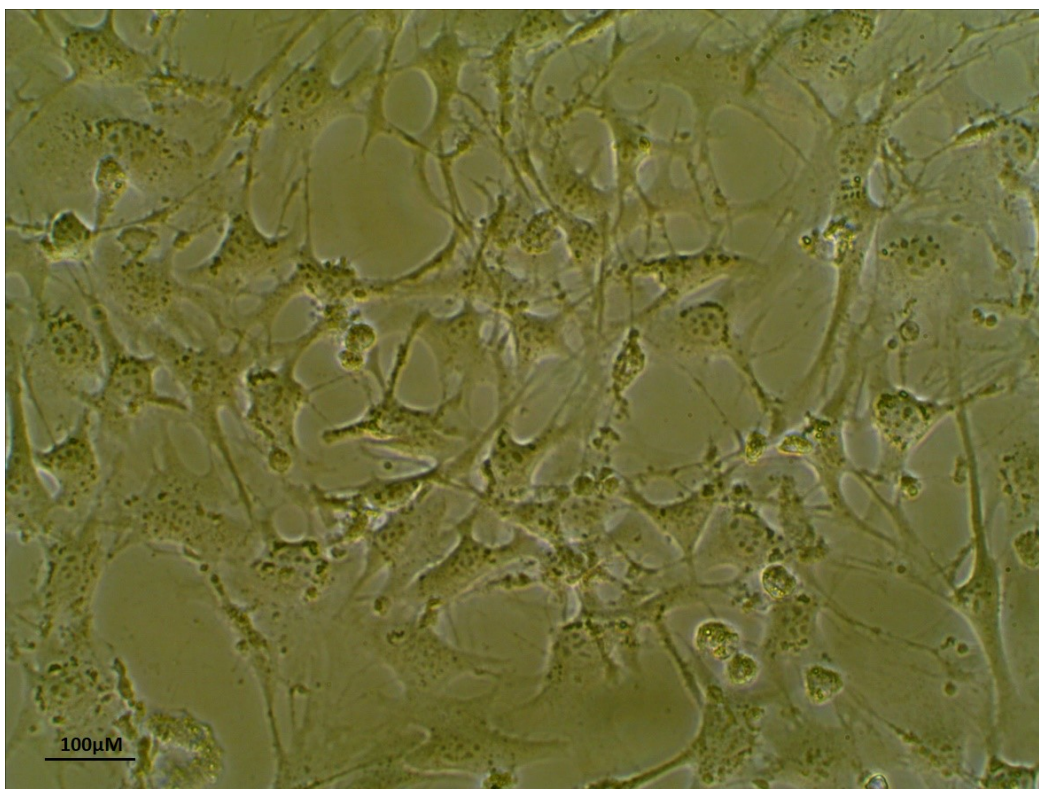
As análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (2365 Northside Dr., Suite 560, San Diego, CA). A equação da reta das curvas de calibração foi obtida com o auxílio do software Microsoft Excel (98052-6399 Redmond, WA).

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

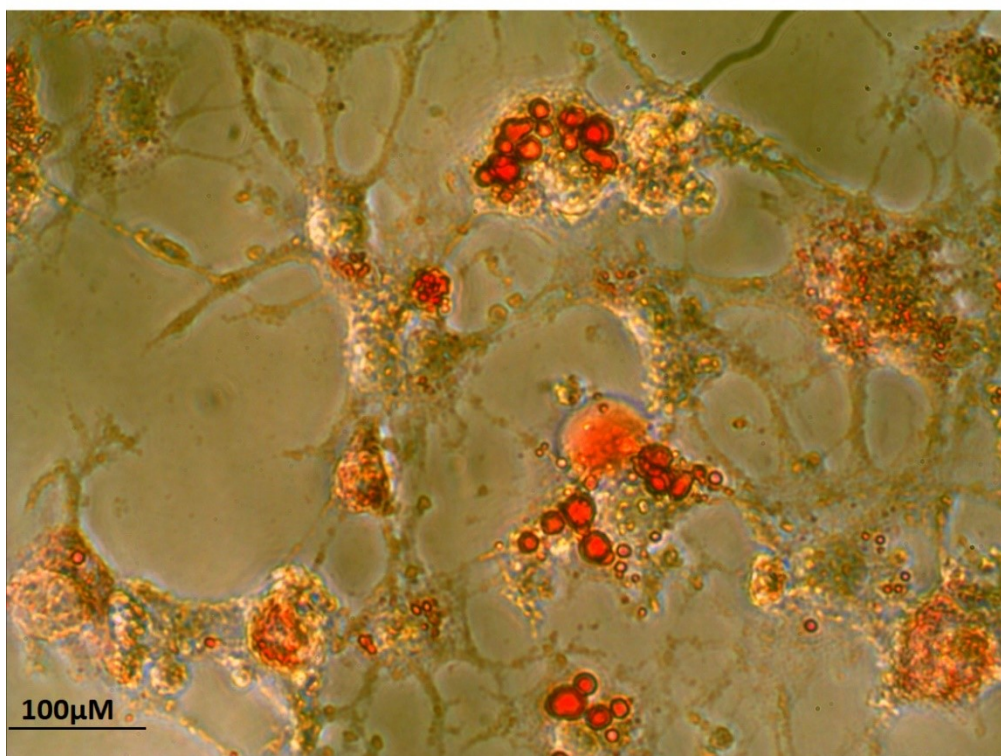
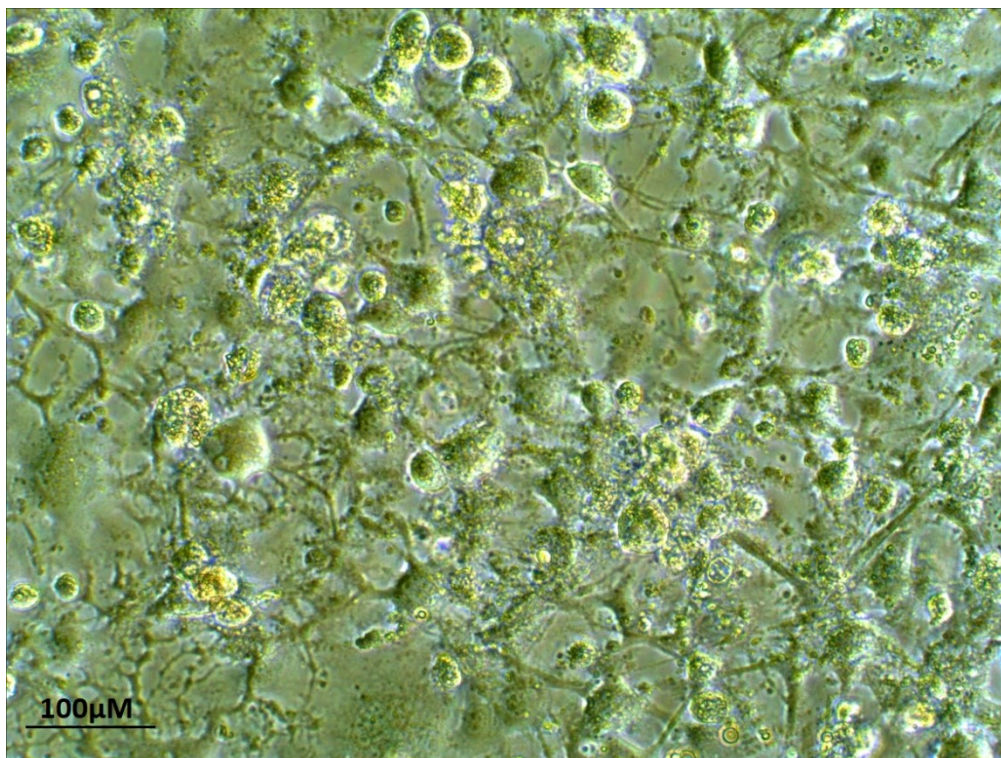
As Figuras 9 e 10 mostram o resultado da diferenciação adipogênica da linhagem de pré-adipócitos murinos 3T3-L1, através da coloração dos lipídios intracelulares com corante lipofílico Oil Red O. Os lipídios intracelulares são corados em tom avermelhado, enquanto as demais estruturas permanecem sem adquirir coloração.

Figura 9 – Pré-adipositos 3T3-L1.



Pré-adipócitos 3T3-L1 (sem diferenciação adipogênica). Acima: sem coloração com Oil Red O. Abaixo: após a coloração com Oil Red O. A ausência de coloração avermelhada nos pré-adipócitos corados com Oil Red O decorre da incapacidade destes em acumular lipídios intracelulares, que são alvo de ligação do corante. Microscopia de campo claro (aumento de 200x).

Figura 10 – Células 3T3-L1 após diferenciação adipogênica.

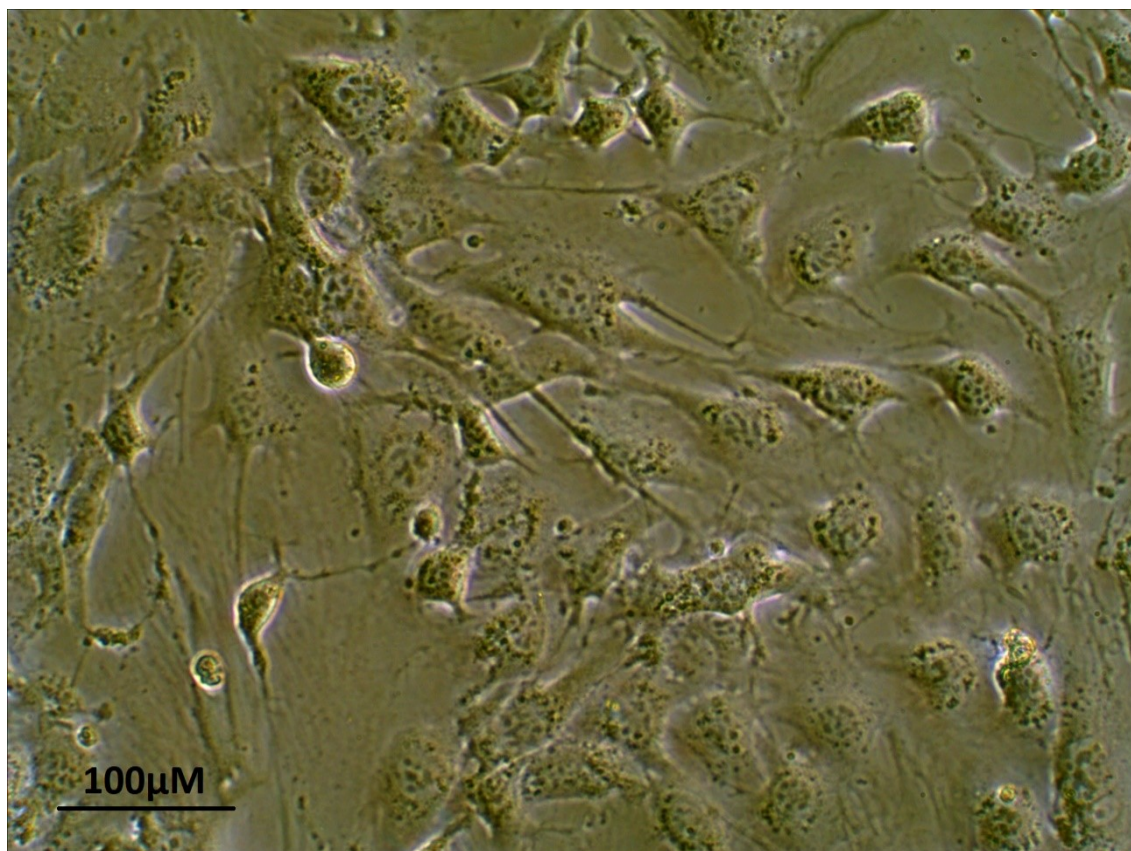


Células 3T3-L1 após diferenciação adipogênica. Acima: sem coloração com Oil Red O. Abaixo: após a coloração com Oil Red O. As gotículas coradas em vermelho ocorrem devido ao acúmulo do corante nas gotículas de lipídios intracelulares. Microscopia de campo claro (aumento de 200x).

5.2 ESTABELECIAMENTO DOS MODELOS DE CO-CULTURA

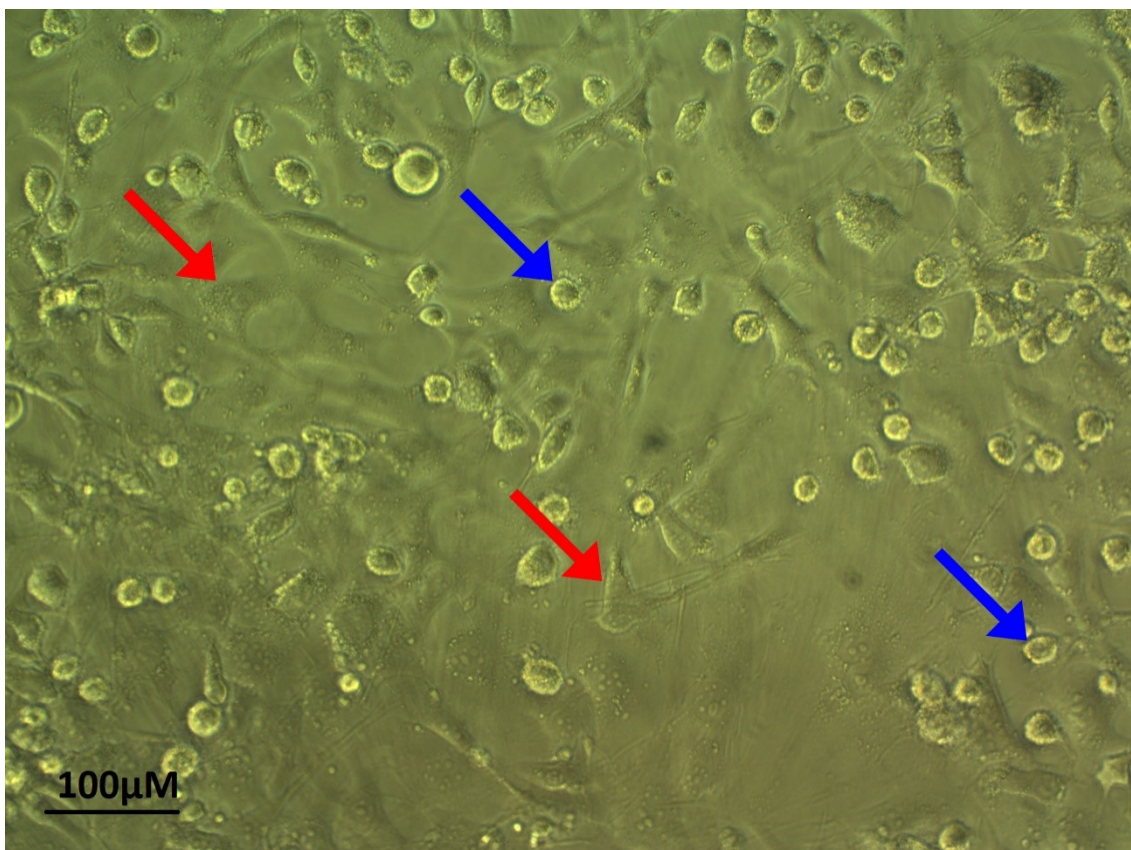
Quatro modelos de co-cultura (Co-Cultura 1, Co-Cultura 2, Co-Cultura 3 e Co-Cultura 4) de adipócitos 3T3 e macrófagos J774 foram tentados. Todos os modelos apresentaram morfologia típica de células viáveis quando observados em microscópio óptico. Morfológicamente, a cultura isolada de células 3T3-L1 apresentou diferenças em relação às co-culturas com células J774, enquanto as co-culturas não apresentaram diferenças morfológicas entre si. A cultura de células 3T3-L1 apresentou mais prolongamentos de aspecto fibroso do que as co-culturas, e nas co-culturas, os dois tipos celulares cresceram de forma intercalada, com aspectos morfológicos distintos para cada tipo (Figuras 11 e 12). No entanto, estas distinções morfológicas não puderam ser visualizadas após a coloração com Oil Red O (Figura 13). Devido à semelhança morfológica entre as co-culturas, todas as fotomicrografias apresentadas neste trabalho se referem somente à Co-Cultura 1.

Figura 11 – 3T3-L1 durante a diferenciação adipogênica.



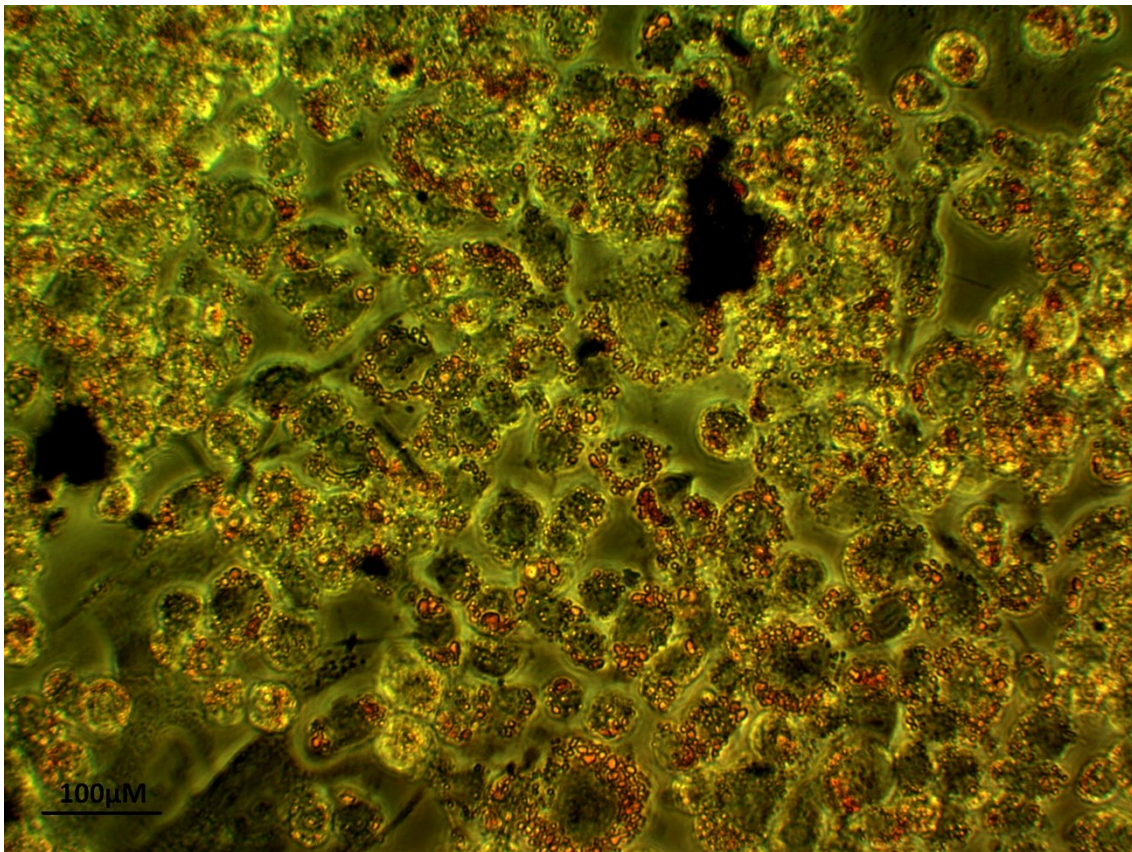
Monocultura de células 3T3-L1 durante processo de diferenciação adipogênica. Microscopia de campo claro (aumento de 200x).

Figura 12 – Co-cultura de 3T3-L1 e J774 pré diferenciação adipogênica.



Co-cultura de células 3T3-L1 (setas vermelhas) e células J774 (setas azuis), durante o processo de diferenciação adipogênica, evidenciando as diferenças morfológicas entre as duas linhagens celulares. Microscopia de campo claro (aumento de 200x).

Figura 13 – Co-cultura de 3T3-L1 e J774 pós diferenciação adipogênica.

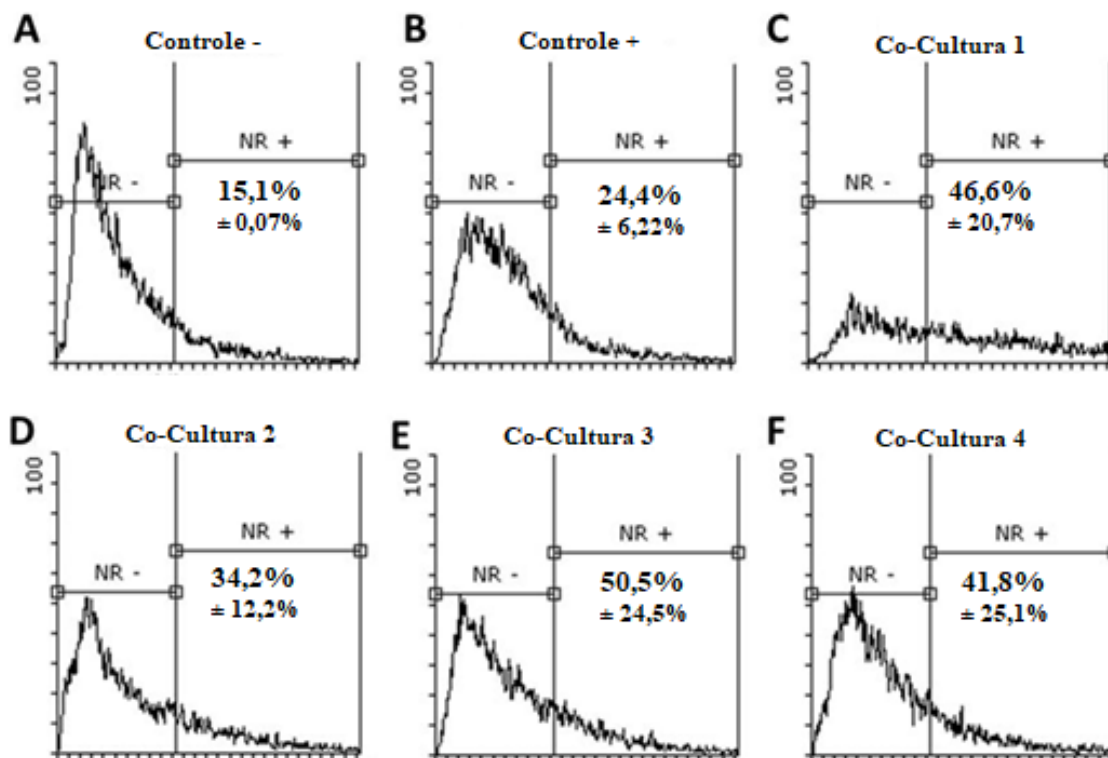


Co-cultura de células 3T3-L1 e células J774 após o processo de diferenciação adipogênica, corada com o corante lipofílico Oil Red O. As gotículas coradas em vermelho ocorrem devido ao acúmulo do corante nas gotículas de lipídios intracelulares. Microscopia de campo claro (aumento de 200x).

5.3 ANÁLISE DA LIPOGÊNESE DOS MODELOS DE CO-CULTURA

Os quatro modelos de co-cultura foram testados em relação ao acúmulo de lipídios intracelulares, avaliados por citometria de fluxo com o corante lipofílico fluorescente Nile Red ($n = 2$). Os percentuais de células Nile Red positivas (com acúmulo de lipídios intracelulares) para cada modelo e para os controles positivo e negativo estão exibidos a seguir (Figura 14). A presença dos macrófagos J774 induziu uma tendência de aumento na taxa de positividade nas co-culturas em relação aos controles.

Figura 14 – Histogramas representativos obtidos pela análise em citômetro de fluxo de células marcadas com corante fluorescente Nile Red.



Histogramas representativos obtidos pela análise em citômetro de fluxo de células marcadas com corante fluorescente Nile Red. NR-, à esquerda dos histogramas, representa a distribuição de células Nile Red negativas (sem acúmulo de lipídios intracelulares), enquanto NR+, à direita dos histogramas, representa a distribuição de células Nile Red positivas (com acúmulo de lipídios intracelulares). O eixo Y representa o número de células e o eixo X o grau de positividade para Nile Red. **A:** controle negativo (células 3T3-L1 não diferenciadas); **B:** controle positivo (células 3T3-L1 diferenciadas com MDI); **C:** Co-Cultura 1; **D:** Co-Cultura 2; **E:** Co-Cultura 3; **F:** Co-Cultura 4 (co-culturas de 3T3-L1 e J774 em diferentes condições de plaqueamento, diferenciadas com MDI). Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Dunnett. N = 2.

Baseando-se na equivalência dos resultados dos diferentes modelos de co-cultura testados, foi escolhido o modelo de Co-Cultura 1 (com plaqueamento simultâneo de células 3T3-L1 e células J774) para as análises posteriores, devido à maior praticidade de plaqueamento que este modelo apresentou em relação aos demais. Este modelo foi posteriormente analisado diante de estímulo adipogênico com MDI.

5.4 PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E ADIPOCINAS EM SISTEMA DE MONOCULTURA, CO-CULTURA E TECIDO ADIPOSEO MURINO

Após a incubação de 11 dias, as culturas celulares receberam estímulo inflamatório com INF- γ e as citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α e as adipocinas leptina e adiponectina foram determinadas no sobrenadante celular. As amostras de tecido adiposo *ex vivo* também foram submetidas ao estímulo inflamatório e testadas em relação às mesmas citocinas e adipocinas no sobrenadante das culturas.

Todas as amostras analisadas para TNF- α permaneceram abaixo do limite de detecção (4 pg/ml).

Não foi possível realizar repetições dos experimentos com o tecido adiposo *ex vivo*, havendo somente um ensaio para cada analito. Não houve valor detectável de IL-6 em nenhuma das amostras de sobrenadante dos tecidos.

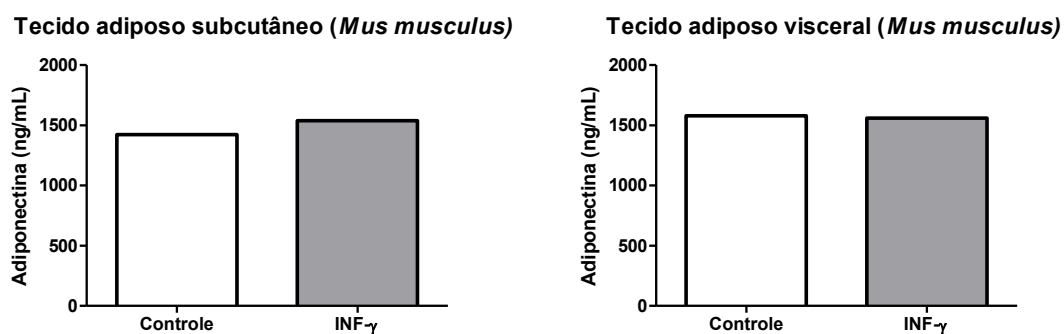
As concentrações de adiponectina em ambos os tecidos não foi afetada pela presença de INF- γ , permanecendo em torno de 1550 ng/mL em todas as amostras. O sobrenadante da cultura do tecido subcutâneo apresentou concentração de leptina de 1180 ng/mL quando não estimulado com INF- γ , reduzindo para 670 ng/mL quando estimulado. O tecido visceral apresentou concentração menor de leptina (100 ng/mL) sem o estímulo inflamatório, em comparação ao tecido visceral com estímulo (200 ng/mL).

No tecido subcutâneo não houve variação da concentração de IL-4 frente ao estímulo inflamatório (60 ng/mL), mas no tecido visceral, a concentração da citocina foi de 40 ng/mL sem o estímulo e 66 ng/mL com o estímulo. No tecido subcutâneo, a citocina IL-10 apresentou concentração de 163 ng/mL sem INF- γ e apenas 31 ng/mL com INF- γ . No tecido visceral, as concentrações de IL-10 foram de 64 ng/mL e de apenas 9 ng/mL, sem ou com estímulo inflamatório, respectivamente.

Os ensaios com as culturas celulares foram realizados em 3 replicatas. Não houve valor detectável de IL-10 ou de adiponectina nas culturas celulares. Não houve diferença significativa entre a ausência e a presença de estímulo com INF- γ para IL-4 na monocultura ($27,6 \pm 26,4$ ng/mL *versus* $41,9 \pm 52,4$ ng/mL) nem na co-cultura ($17,5 \pm 9,9$ ng/mL *versus* $10,2 \pm 5,3$ ng/mL). Da mesma forma, o INF- γ não modificou as concentrações de leptina na monocultura 3T3-L1 ($103 \pm 6,7$ ng/mL *versus* $113 \pm 11,7$ ng/mL) ou na co-cultura 3T3-L1/macrófago ($156 \pm 55,0$ ng/mL *versus* $376 \pm 116,0$ ng/mL). A citocina pró-inflamatória IL-6 apresentou concentrações mais baixas ($P < 0,05$) na ausência de INF- γ quando comparadas à presença de INF- γ , tanto na

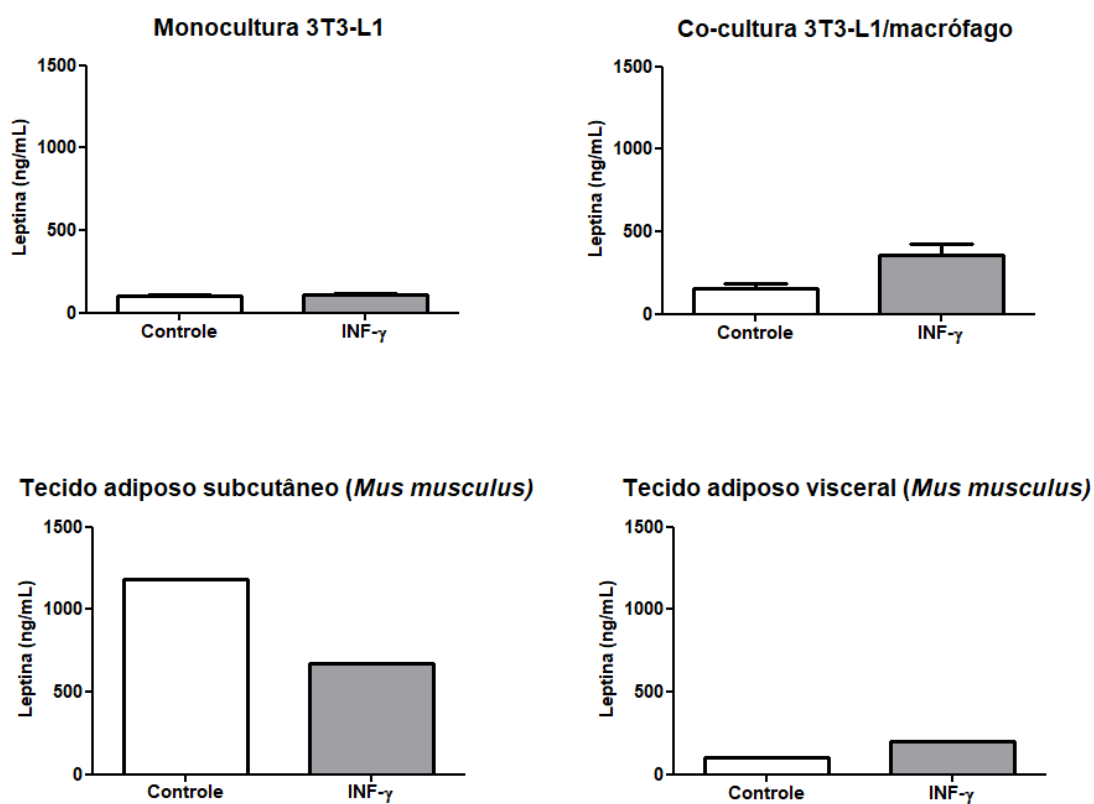
monocultura ($54,5 \pm 42,2$ ng/mL *versus* $208,0 \pm 59,7$ ng/mL) quando na co-cultura ($256,3 \pm 34,9$ ng/mL *versus* $366,9 \pm 33,3$ ng/mL). Estes resultados estão expressos nas figuras a seguir (Figura 15 a Figura 19).

Figura 15 – Valores absolutos de adiponectina pelo método ELISA.



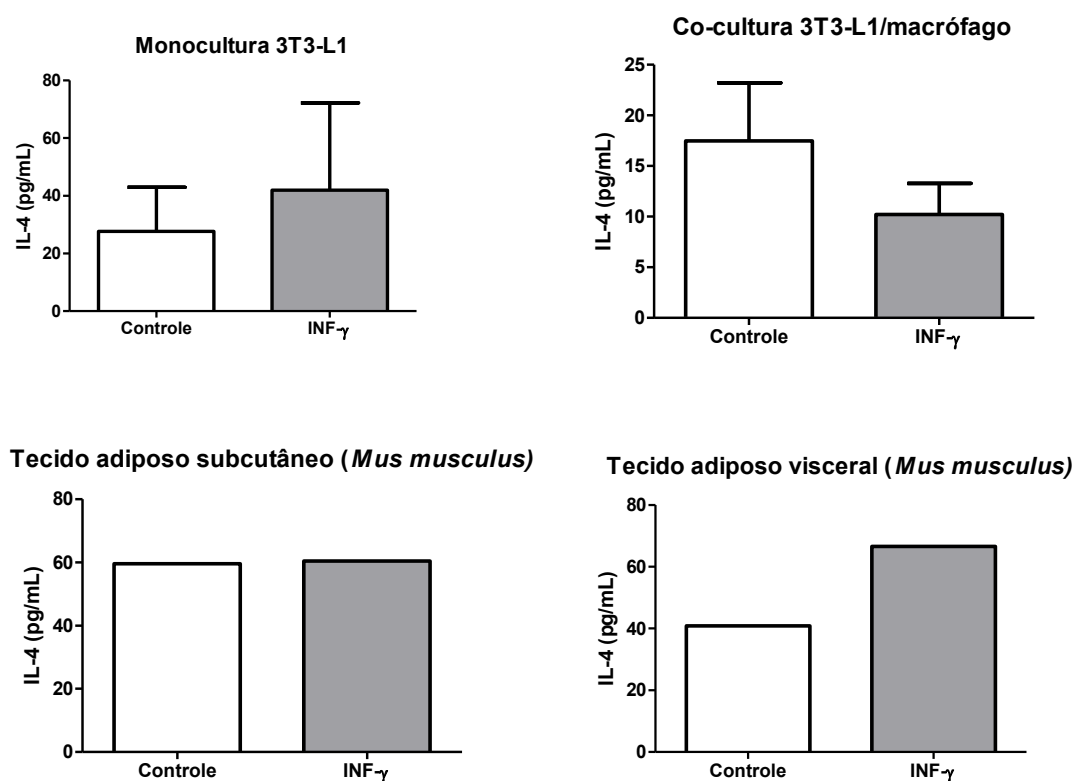
Valores de absorvância de ensaio ELISA de adiponectina após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em valores absolutos.

Figura 16 – Valores absolutos de leptina pelo método ELISA.



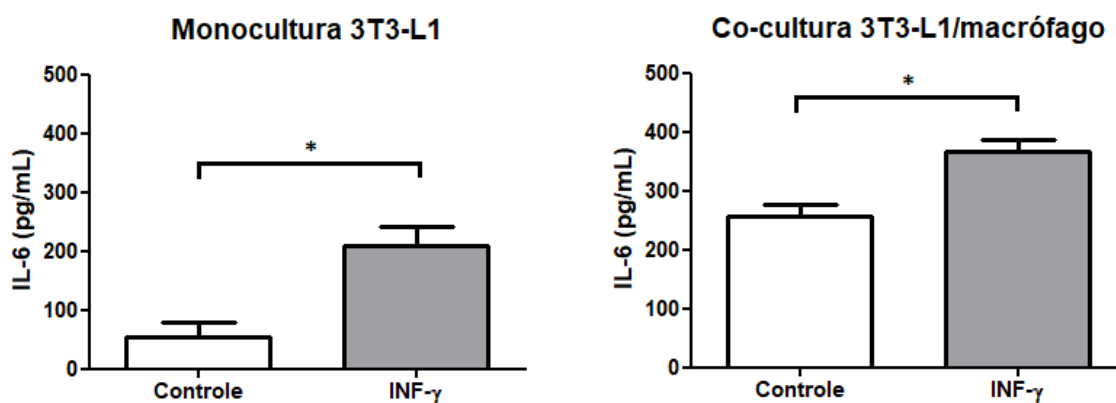
Valores de absorvância de ensaio ELISA de leptina após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média e desvio padrão (culturas celulares) ou valores absolutos (tecidos). Análise estatística por teste t não-paramétrico (culturas celulares).

Figura 17 – Valores absolutos de IL-4 pelo método ELISA.



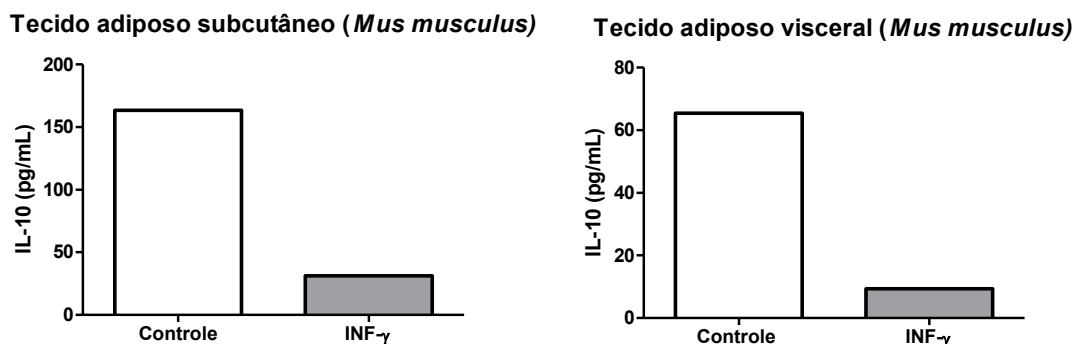
Valores de absorbância de ensaio ELISA de IL-4 após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média e desvio padrão (culturas celulares) ou valores absolutos (tecidos). Análise estatística por teste t não-paramétrico (culturas celulares).

Figura 18 – Valores absolutos de IL-6 pelo método ELISA.



Valores de absorbância de ensaio ELISA de IL-6 após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média e desvio padrão. *: $p < 0.05$. Análise estatística por teste t não-paramétrico.

Figura 19 – Valores absolutos de IL-10 pelo método ELISA.



Valores de absorvância de ensaio ELISA de IL-10 após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em valores absolutos.

5.5 ATIVIDADE DA ENZIMA IDO *IN VITRO*

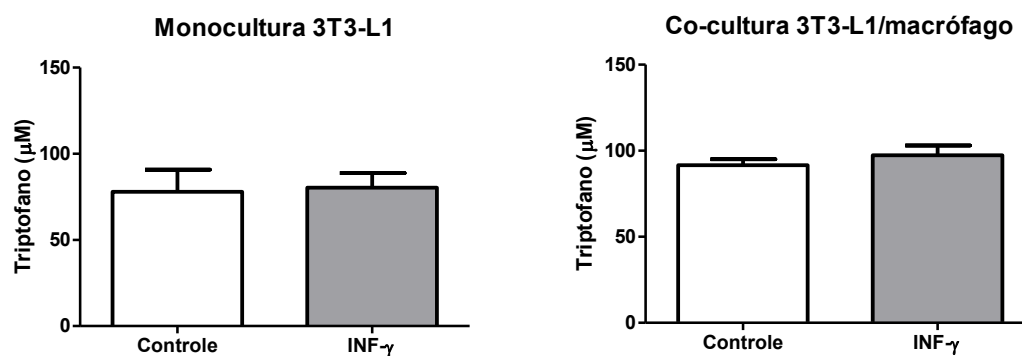
Avaliou-se a atividade da IDO pela concentração de quinurenina (μM) dividida pela concentração de triptofano (mM) no sobrenadante celular das amostras, medidas por HPLC. Para converter os valores detectados em concentrações dos analitos, realizou-se uma curva padrão (Figura 20). O valor de R^2 da curva de quinurenina foi de 0,9988, e o da curva de triptofano foi de 0,9925.

Não houve diferença estatística nas concentrações de quinurenina sem ($0,784 \pm 0,057$ mM) ou com ($1,011 \pm 0,176$ mM) estímulo com INF- γ nos adipócitos 3T3-L1 isolados. Na co-cultura, houve redução significativa das concentrações de quinurenina quando as células foram expostas ao estímulo com INF- γ ($0,532 \pm 0,011$ mM) em relação às células sem estímulo ($0,806 \pm 0,170$ mM) (Figura 21).

Todas as culturas apresentaram concentrações similares de triptofano. As células 3T3-L1 isoladas sem estímulo apresentaram concentrações de $77,999 \pm 12,869$ mM, e com estímulo inflamatório de $80,270 \pm 8,572$ mM. A co-cultura sem exposição ao INF- γ apresentou concentrações de $91,529 \pm 6,116$ mM, enquanto a exposta ao INF- γ apresentou concentrações de $97,257 \pm 9,968$ mM (Figura 22).

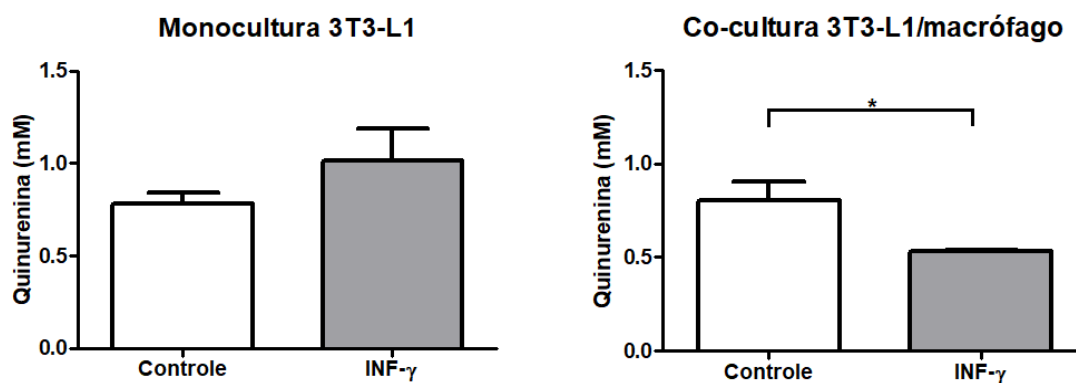
Diante destas concentrações dos metabólitos, a atividade da IDO foi calculada para cada amostra. Não foi possível observar diferença estatística na atividade da IDO com ou sem estímulo inflamatório tanto nas células 3T3-L1 isoladas ($10,298 \pm 2,279$ versus $12,561 \pm 1,365$), quanto na co-cultura ($8,897 \pm 2,412$ versus $5,505 \pm 0,459$) (Figura 22).

Figura 20 – Concentração de triptofano em 3T3-L1 e co-cultura.



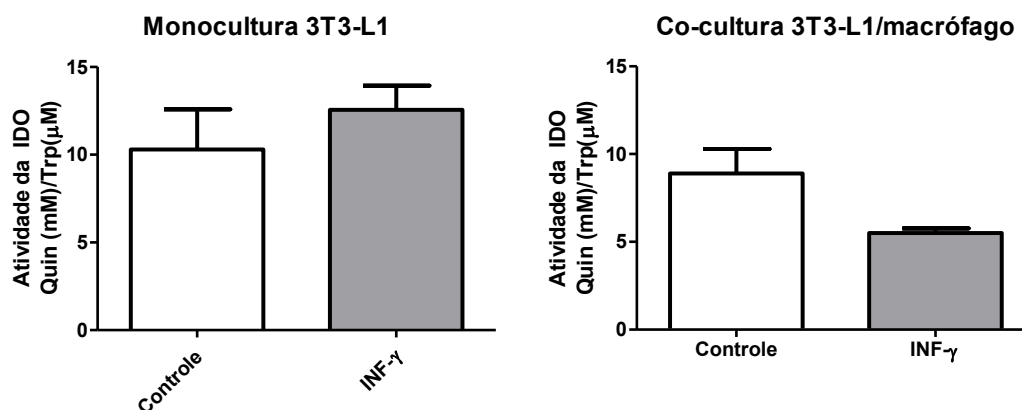
Concentrações de triptofano após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Análise estatística por teste t não-paramétrico.

Figura 21 – Concentração de quinurenina em 3T3-L1 e co-cultura.



Concentrações de quinurenina após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média \pm desvio padrão. *: $p < 0.05$. Análise estatística por teste t não-paramétrico.

Figura 22 – Atividade calculada de IDO em 3T3-L1 e co-cultura.



Atividade calculada da IDO após 48 horas de incubação com ou sem estímulo com INF- γ . Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Análise estatística por teste t não-paramétrico.

5.6 EXPRESSÃO DO GENE IDO1 NO TECIDO ADIPOSEO *EX VIVO*

Avaliou-se a expressão do gene IDO1 nas amostras de tecido adiposo *ex vivo* frente a estímulo inflamatório com INF- γ . Primeiramente realizou-se o isolamento do mRNA das amostras, em duplicata. A quantidade de mRNA isolada de cada amostra variou de 0,098 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 0,367 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, com uma média de 0,189 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e um desvio padrão de 0,079. A razão 260/280 nm variou de 1,376 a 1,792 (média 1,514 e desvio padrão 0,139), e a razão 260/230 variou de 0,111 a 0,488 (média 0,296 e desvio padrão 0,084). A quantidade de mRNA de cada amostra foi normalizada para o menor valor.

Após a síntese do cDNA com transcriptase reversa, procedeu-se à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A eficiência da reação foi calculada com auxílio do software LinRegPCR, resultando em um valor médio de 1,852. A reação é considerada eficiente quando este valor se encontra acima de 1,8. Todas as amostras que apresentaram amplificação estiveram acima do valor de 1,8.

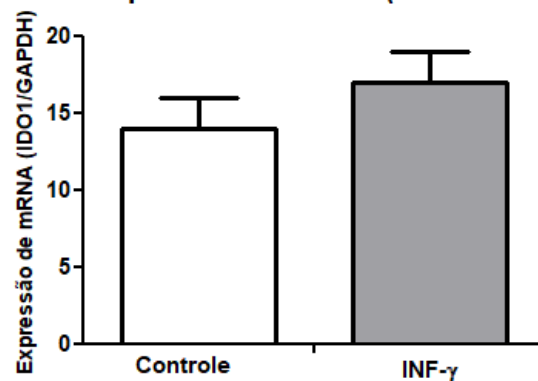
Observou-se uma diferença significativa na média da expressão do gene controle (GAPDH) entre o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo visceral, mesmo com a normalização da quantidade total de mRNA obtido na etapa do isolamento. O tecido adiposo subcutâneo apresentou ampliação média do gene GAPDH no ciclo 24,92, enquanto o tecido adiposo visceral no ciclo 31,70.

As amostras de tecido adiposo visceral foram incapazes de expressar o gene IDO1, independentemente do estímulo com INF- γ . Nas amostras de tecido subcutâneo, não

houve diferença estatística no valor de Δ -CT do gene IDO1 em relação à ausência ($13,92 \pm 0,57$) ou presença ($16,42 \pm 1,22$) do estímulo com INF- γ , apesar de se observar uma tendência de aumento (Figura 23).

Figura 23 - Δ -CT do gene IDO1 frente ao estímulo com INF- γ .

Tecido adiposo subcutâneo (*Mus musculus*)



Valores de Δ -CT do gene IDO1 em amostras de tecido adiposo murino, frente a estímulo inflamatório com INF- γ . O gene controle utilizado para estabelecer o valor de Δ -CT foi GAPDH. Análise estatística por teste t não-paramétrico. N = 2.

Diante da tendência de aumento de expressão do gene IDO1 no tecido subcutâneo estimulado com INF- γ , o $\Delta\Delta$ -CT (diferença de expressão gênica relativa) do gene IDO1 frente ao tratamento com interferon apresentou valor positivo de 2,50.

6. DISCUSSÃO

O tecido adiposo é um órgão endócrino de grande importância, responsável por regular uma variedade de processos metabólicos no organismo. Assim, a disfunção deste tecido provocada pela alteração de seu microambiente, em função da hipertrofia dos adipócitos na obesidade, está diretamente relacionada a alterações fisiopatológicas das vias metabólicas (CHOE et al., 2016; COOKE et al., 2016).

O INF é uma citocina pró-inflamatória cuja concentração se encontra aumentada em diversos contextos patológicos, incluindo a metainflamação da obesidade (GREGOR et al., 2011; ZHANG et al., 2018). Esta citocina pode ser produzida por linfócitos T pró-inflamatórios que se infiltram no tecido adiposo hipertrofiado, participando do início do processo de estabelecimento da inflamação crônica (CALDERON et al., 2008; KINTSCHER et al., 2008; O'ROURKE et al., 2009). Além disso, o INF é um importante ativador da enzima IDO, levando ao direcionamento do metabolismo do triptofano para a via das quinureninas (O'CONNOR et al., 2009). Assim, o emprego desta citocina em ensaios biológicos apresenta potencial para elucidar questões relacionadas à metainflamação da obesidade e a via das quinureninas.

Estudos *in vitro* sobre obesidade visam compreender o microambiente do tecido adiposo e os mecanismos envolvidos na promoção das comorbidades associadas a esta doença. Muitos destes estudos utilizam adipócitos maduros, geralmente obtidos a partir da diferenciação *in vitro* de pré-adipócitos, para avaliar estes mecanismos, na tentativa de mimetizar o que ocorre no organismo *in vivo* (SOUZA et al., 2003; SCHMID et al., 2005; BRADLEY et al., 2008; LI et al., 2016). No entanto, o tecido adiposo é um órgão complexo, dotado de matriz extracelular e diferentes tipos celulares, capazes de interagir entre si através de sistemas complexos de comunicação autócrina, parácrina e endócrina (LUMENG et al., 2007; OUCHI et al., 2011). Diante disto, se torna necessário adotar estratégias com o intuito de aproximar as características do ambiente celular *in vitro* às do microambiente do tecido adiposo no organismo, a fim de se obter resultados que possam ser extrapolados mais fidedignamente aos processos que ocorrem *in vivo*. Entre estas estratégias, é possível citar o cultivo de modelos de co-cultura celular, nos quais duas ou mais linhagens celulares são cultivadas simultaneamente (IDRIS et al., 2019; ZHANG et al., 2019; YAO et al., 2020); o cultivo celular tridimensional (3D), no qual as células de uma ou mais linhagens são cultivadas na ausência de uma superfície aderente, permitindo que ocorra agregação celular e consequente formação de estruturas esféricas

(ACHILLI et al., 2012; SILVA et al., 2015); e os modelos *ex-vivo*, nos quais o tecido a ser estudado é extraído de animais ou pacientes humanos e submetido a análises experimentais (REZZOLA et al., 2014; FRIEDRICHS et al., 2018; McLEAN et al., 2018).

Neste trabalho, primeiramente foi estabelecido o protocolo de diferenciação da monocultura da linhagem de pré-adipócitos murinos 3T3-L1, com a adição do MDI, meio de diferenciação celular, após 48 h de confluência dos pré-adipócitos, levando a um tempo total de 11 dias até a obtenção de adipócitos maduros. Posteriormente, o mesmo protocolo foi usado para a diferenciação dos pré-adipócitos em co-cultura com macrófagos murinos da linhagem J774 (J774A.1). A diferenciação adipogênica foi confirmada por visualização em microscópio óptico com marcação dos lipídeos intracelulares com corante lipofílico *Oil Red O* e por análise de citometria de fluxo com corante lipofílico fluorescente *Nile red*. Ambos os corantes são classicamente empregados para a detecção de lipídeo intracelular com diferentes técnicas de análise (FOWLER, GREENSPAN, 1985).

Dentro da estratégia de modelos de co-cultura bidimensional (2D), o cultivo simultâneo de macrófagos e adipócitos tem sido utilizado na tentativa de compreender as interações entre estes dois tipos celulares, que são os mais metabolicamente ativos entre os diversos tipos celulares presentes no tecido adiposo. Isto torna possível uma melhor compreensão do processo de inflamação crônica mediada pelo tecido adiposo e suas consequências metabólicas, como a resistência à insulina, a diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica (SUGANAMI et al., 2005; NAKARAI et al., 2012; GAMBARO et al., 2018; SONG et al., 2018; KIM et al., 2019). Macrófagos também são importantes mediadores da proliferação de pré-adipócitos e diferenciação adipogênica, evidenciando a plasticidade destes dois tipos celulares diante das interações parácrinas que ocorrem entre eles quando interagem no tecido adiposo (CHAZENBALK et al., 2011). O tecido adiposo é capaz de liberar diferentes citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, podendo modificar o perfil de liberação destas conforme o estímulo realizado, e as interações entre macrófagos e adipócitos são fundamentais para o estabelecimento destes perfis (COPPACK, 2001).

O modelo de co-cultura foi estabelecido com a associação de pré-adipócitos 3T3-L1 e macrófagos J774, devido à conveniência e facilidade de obtenção e cultivo destas duas linhagens celulares, bem como suas características fenotípicas adequadas. A partir de diferentes configurações foi possível estabelecer um modelo no qual as duas linhagens

celulares foram adicionadas simultaneamente à placa de cultura, permitindo que interagissem durante todo o processo de diferenciação adipogênica.

Realizou-se a análise da atividade da IDO através das concentrações de quinurenina e triptofano nos sobrenadantes das células 3T3-L1 e da co-cultura de células 3T3-L1 e macrófagos, frente ao estímulo inflamatório com INF- γ . Não foi possível observar alterações significativas nas concentrações do triptofano e da atividade calculada da IDO, apesar de ter sido encontrada uma redução das concentrações de quinurenina na co-cultura exposta ao INF- γ em comparação à co-cultura sem o estímulo. Apesar de ser descrito na literatura que a IDO também pode ser expressa em macrófagos (YAMAZAKI et al., 1985; UHLEN et al., 2015; THUL et al., 2017), os dados sobre a capacidade da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 em expressar a enzima são poucos e sugerem uma baixa capacidade da linhagem em produzir a enzima (ROSHICK et al., 2006; HOFFMANN et al., 2019). Isto poderia explicar a ausência de influência do INF- γ nas concentrações de triptofano e a redução inesperada que foi observada de quinurenina, sugerindo que o modelo não é adequado para o estudo *in vitro* da via das quinureninas. Quando se avaliou o perfil de liberação de citocinas, também não foi possível observar alterações significativas na maioria dos analitos, exceto na citocina pró-inflamatória IL-6. Esta citocina apresentou aumento frente ao INF- γ tanto na monocultura quanto na co-cultura, evidenciando a capacidade dos adipócitos 3T3-L1 em produzi-la, fazendo com que a molécula aja como uma adipocina, de forma semelhante ao que se encontra na literatura (MONZILLO, 2003).

Modelos de estudo *ex vivo* podem ser conduzidos com o objetivo de avaliar parâmetros bioquímicos de forma mais adequada do que seria possível em modelos de cultura celular e, ao mesmo tempo, mais específica do que o alcançável em estudos *in vivo* ou estudos clínicos, podendo, ainda, complementar estes últimos (TIMMERS et al., 2011; FAN et al., 2015; DE LIGHT et al., 2018). Neste contexto, o estudo *ex vivo* do tecido adiposo se torna atrativo ao permitir a análise do comportamento deste tecido em diferentes condições, tornando-o uma ferramenta útil na pesquisa por mecanismos bioquímicos pelos quais os fenômenos observados *in vivo* ou em estudos clínicos podem ocorrer. No entanto, é necessário considerar que, mesmo tendo o potencial de se aproximar mais do que ocorre no organismo vivo em comparação a ensaios *in vitro* clássicos, a análise de parâmetros bioquímicos *ex vivo*, em especial do tecido adiposo, nem sempre corresponde ao observado no organismo, já que as diversas interações bioquímicas necessárias à produção destes fenômenos não ocorrem somente de forma

autócrina e parácrina, que ainda ocorrem nos ensaios *ex vivo*, mas também de forma endócrina (BATHKE et al, 2015; FRIEDRICHS et al., 2018; CERVONE et al., 2019). Assim, o tecido adiposo pode não responder à presença de adipocinas em condições *ex vivo* da mesma forma que responderia no organismo (CERVONE et al., 2019).

No presente trabalho, o tecido adiposo *ex vivo* de camundongos foi utilizado para a análise da expressão do gene IDO1 e para a avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α e adipocinas leptina e adiponectina frente ao estímulo inflamatório com INF- γ murino. A tendência de aumento de expressão do gene IDO1 sugere que o aumento da expressão deste gene, correlacionado ao aumento da atividade da enzima IDO frente a estímulos inflamatórios, possa ocorrer também dentro do tecido adiposo de camundongos. Isto permite que se levante a hipótese de que o aumento da atividade desta enzima em indivíduos obesos e o consequente direcionamento do metabolismo do triptofano pela via das quinureninas ocorra como consequência direta à metainflamação do tecido adiposo hipertrofiado, levando ao aumento da incidência de transtornos psiquiátricos, como a depressão, que se observa nestes indivíduos (CARMO et al., 2017). No entanto, cabe ressaltar que a tendência de aumento de expressão de IDO observada não é suficiente para elucidar tal hipótese e o papel do tecido adiposo humano no aumento da atividade da IDO frente à obesidade ainda não foi testado experimentalmente.

Ainda no contexto da IDO no tecido *ex vivo*, é importante destacar que não se observou expressão do gene IDO1 no tecido visceral. Simultaneamente, o tecido apresentou uma fraca expressão do gene controle, GAPDH, cujo ponto de corte de detecção se deu apenas no ciclo 31,7, apesar de ter havido padronização da quantidade tota de RNA das amostras na etapa anterior à reação em cadeia da polimerase. Isto sugere algum tipo de falha metodológica na qual, apesar do RNA total estar presente, não estar íntegro o suficiente para haver uma amplificação adequada. Assim, a incapacidade observada do tecido *ex vivo* visceral em expressar o gene IDO1 pode não ser condizente com o que de fato ocorre no organismo. Uma possibilidade para contornar este problema seria reduzir ou eliminar completamente o tempo de incubação do tecido *ex vivo* com meio de cultura antes da realização do tratamento, na tentativa de preservar a integralidade do material genético do tecido.

De forma parecida com o observado por Cervone e colaboradores, o tecido adiposo *ex vivo* não respondeu ao estímulo inflamatório em relação à adiponectina, ao contrário do que seria esperado. No entanto, foi possível observar uma redução de cerca de 2 vezes na concentração de leptina diante da presença de INF- γ no tecido subcutâneo.

Paradoxalmente, o tecido visceral apresentou aumento na concentração de leptina diante do estímulo inflamatório, mas tanto sem o estímulo quanto com o estímulo, este tecido apresentou concentrações muito menores de leptina do que o subcutâneo. A leptina é um hormônio com diferentes funções no organismo, com importante ação no sistema nervoso central, em especial no hipotálamo, capaz de levar à redução do apetite e aumento do gasto calórico (NEGRÃO, LICINIO, 2012). Assim, os resultados deste trabalho sugerem que o tecido adiposo subcutâneo inflamado apresenta uma redução na capacidade de produção deste hormônio, o que poderia contribuir para a hiperfagia e perpetuação do estado de obesidade. Ainda, é possível observar um aumento discreto da concentração da citocina pró-inflamatória IL-4 no tecido visceral e uma redução drástica (de 5 a 7 vezes) das concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10 em ambos os tecidos, tornando evidente a capacidade do tecido adiposo em exacerbar o estado inflamatório, levando à manutenção da metainflamação característica à obesidade.

Por fim, é necessário considerar que a impossibilidade técnica neste trabalho em utilizar camundongos obesos, levando ao uso do tecido adiposo de animais magros no qual apenas se simulou a metainflamação da obesidade através do INF- γ , acrescenta uma camada extra de dificuldade na extrapolação dos dados obtidos para o que ocorre no organismo de indivíduos obesos. A utilização do tecido adiposo de animais obesos poderia apresentar um perfil bioquímico mais próximo dos conhecimentos presentes na literatura acerca da obesidade e da inflamação crônica dela decorrente.

7. CONCLUSÕES

Diante do exposto neste trabalho, é possível concluir que o modelo de co-cultura bidimensional com a linhagem de pré-adipócitos murinos 3T3-L1 diferenciados em adipócitos em combinação com a linhagem de macrófagos murinos J774A.1 não foi capaz de produzir um perfil completo de produção de citocinas e adipocinas frente ao estímulo inflamatório semelhante ao esperado *in vivo*, nem foi capaz de demonstrar atividade da enzima IDO para um estudo adequado da via das quinureninas no tecido adiposo. No entanto, o modelo se demonstrou viável para o estudo das características fenotípicas do tecido adiposo em relação à lipogênese, acúmulo de lipídios intracelulares nos adipócitos maduros e produção da adipocina IL-6 frente ao estímulo inflamatório com INF- γ , simulando *in vitro* estas características de forma adequada.

O modelo de tecido adiposo murino *ex vivo* também não apresentou um perfil completo de produção de citocinas e adipocinas como seria esperado, evidenciando a limitação deste modelo para tais estudos. A impossibilidade de se fazer repetições dos ensaios neste trabalho também gera a necessidade de se considerarem os resultados obtidos com cautela. É possível observar, no entanto, que o modelo *ex vivo* de tecido adiposo subcutâneo inflamado parece ter sua capacidade de produção de leptina reduzida em comparação ao não inflamado, simulando adequadamente o que se observa *in vivo* diante da metainflamação da obesidade. A redução drástica da produção de IL-10 em ambos os tecidos frente ao estímulo inflamatório mostra que o modelo parece simular a perpetuação do estado inflamatório na obesidade, merecendo uma investigação mais profunda deste fenômeno. Ainda, o tecido subcutâneo demonstrou ser capaz de expressar o gene da enzima IDO e a tendência de aumento desta expressão frente ao INF- γ sugere não apenas que o tecido adiposo participe diretamente do aumento do direcionamento do metabolismo do triptofano para a via das quinureninas, mas também que o modelo *ex vivo* possa ser adequado para estudar esta participação em detalhes. Mais estudos são necessários para confirmar os resultados observados neste trabalho e responder às hipóteses levantadas pelo autor.

8. REFERÊNCIAS

ACHILLI, T.-M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi- cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347–1360, 2012.

Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Diretoria de Normas e Habilitação de Produtos. Gerência-Geral de Regulação Assistencial. Gerência de Monitoramento Assistencial. Coordenadoria de Informações Assistenciais. **Manual de diretrizes para o enfrentamento da obesidade na saúde suplementar brasileira**. Rio de Janeiro: ANS, 2017. Bibliografia: p. 41-44. ISBN 9788563059369. Disponível em: <http://biblioteca-ans/index.php?codigo_sophia=8186>. Acesso em: 21 mai. 2020.

AKEMI, H. O. et al. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. **Gene**, v. 105, n. 2, p. 221-7, 1991.

American Psychiatric Association (APA). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)**. Washington, DC, 2013.

ARMANI, A. et al. Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 572, n. April, p. 564–572, 2010.

AVRAM, M. M.; AVRAM, A. S.; JAMES, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. **American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 472–492, 2007.

BADAWY, A. A-B. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 10, 2017.

BASTARD, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v.17, n.1, p. 4-12, 2006.

BATHKE, M. M. et al. Sex and depot differences in ex vivo adipose tissue fatty acid storage and glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 9, p. 830-46, 2015.

BENDER, D. A., McCREANOR, G. M. The preferred route of kynurenine metabolism in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 717, n. 3, p. 56-60, 1982.

BONACCORSO, S. et al. Increased Depressive Ratings in Patients With Hepatitis C Receiving Interferon- α -Based Immunotherapy Are Related to Interferon- α -Induced Changes in the Serotonergic System. **Journal of clinical psychopharmacology**, n. 22, p. 86-90, 2002.

BONDA, D. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. **Redox Report**, v. 15, n. 4, p. 161-8, 2010.

BRADLEY, R. L. et al. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF- α and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. **Obesity**, v. 16, n. 5, p. 938-944, 2008.

BRANDACHER, G. et al. Bariatric Surgery Cannot Prevent Tryptophan Depletion Due to Chronic Immune Activation in Morbidly Obese Patients. **Obesity Surgery**, n. 16, p. 541-586, 2006.

CALDERON, B. et al. Interferon- γ -dependent regulatory circuits in immune inflammation highlighted in diabetes. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 6949-74, 2008.

CAMPBELL, B. M. et al. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. **Frontiers of Neuroscience**, p. 8-12, 2014.

CARMO, Í. A. R. **Indoleamina 2,3-dioxigenase em soro de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica**. Tese (trabalho de conclusão de curso). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

CARRIÈRE, A. et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. **Diabetes**, v. 63, p. 3253–3265, 2014.

CEPPO, F. et al. Implication of the Tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 951–964, 2014.

CERVONE, D. T. et al. Acylated and unacylated ghrelin directly regulate β -3 stimulated lipid turnover in rodent subcutaneous and visceral adipose tissue *ex vivo* but not *in vivo*. **Adipocyte**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2019.

CHAZENBALK, G. et al. Novel Pathway of Adipogenesis through Cross-Talk between Adipose Tissue Macrophages , Adipose Stem Cells and Adipocytes : Evidence of Cell Plasticity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

CINTI S, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347-55, 2005.

CLIFT, M. J. D. et al. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 723–731, 2011.

COELHO, M. et al. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science : AMS** vol. 9,2: 191-200, 2013.

CONDE, J. et al. Adipokines: BioFactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. **BioFactors**, v. 37, n. 6, p. 413–20, 2011.

COOKE, A. A. et al. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 207–214, 2016.

COPPACK, S. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, vol. 60, n. 3, p. 349-356, 2001.

DE LIGHT, M. et al. Resveratrol improves *ex vivo* mitochondrial function but does not affect insulin sensitivity or brown adipose tissue in first degree relatives of patients with type 2 diabetes. **Molecular Metabolism**, v. 12, p. 39-47, 2018.

DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017.

DUSINSKA, M. et al. Chapter 3 - Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo. FADEEL, B. et al. **Adverse Effects of Engineered Nanomaterials**. Academic Press, 2017, p. 51-82.

ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 88, p. 1055-8, 2003.

FAIN, J.N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. **Vitamins and Hormones**, v.74, p. 443-77, 2006.

FAN, X. et al. Correlation of In Vivo and Ex Vivo ADC and T2 of In Situ and Invasive Murine Mammary Cancers. **Plos One**, v. 10, n. 7, e0129212, 2015.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-9, 2005.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p.263–273, 2006.

FAVENNEC, M. et al. The Kynurenine Pathway is Activated in Human Obesity and Shifted Toward Kynurenine Monooxygenase Activation. **Obesity**, n. 23, vol. 10, p. 2066-2074, 2015.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. et al. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1032–1039, 2012.

FINKELSTEIN, J. A. et al. Brain serotonergic activity and plasma amino acid levels in genetically obese Zucker rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, n. 17, vol. 5, p. 939 – 944, 1982.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 50, n. 2, p. 188–194, 2006.

FOWLER, S. D.; GREENSPAN, P. Application of Nile Red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neural lipid deposits in tissue sections: comparison with Oil Red O'. **Journal of Histochemistry and Histochemical Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 833–836, 1985.

FOX, C. S. et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation**, n. 116, p. 39-48, 2007.

FRIEDRICHS, M. et al. Circadian clock rhythms in different adipose tissue model systems. **Chronobiology International**, v. 35, n. 11, p. 1543-52, 2018.

GALIC, S. et al. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129-39, 2010.

GAMBARO, S. E. et al. M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 173-82, 2018.

GONG, Y. et al. The potential biological mechanisms of obesity effects on depression: A systematic review of the literature and knowledge mining. **Health**, vol. 5, n. 11, p. 1811-1818, 2013.

GREGOR, M.F. et al. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual Review of Immunology**, vol. 3, n. 29, p. 415-445, 2011.

GUO, W. et al. Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 216–23, 2009.

HAYAISHI, O. Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. **Recent Advances in Tryptophan Research**, v. 398, p. 285-9, 1996.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252-63, 2013.

HOFFMANN, D. et al. Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase expression in human monocytic leukemia/lymphoma cell lines THP-1 and U937. **International Journal of Tryptophan Research**, vol. 12, 2019.

HOLICKÁ, M. et al. The effect of interferon-gamma and lipopolysaccharide on the growth of *Francisella tularensis* LVS in murine macrophage-like cell line J774. **Acta Medica**, v. 52, n. 3, p. 1001-6, 2009.

HONG, J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8(+) T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 5, p. 621-9, 2016.

HUGHES, M. M. et al. Tryptophan Depletion in Depressed Patients Occurs Independent of Kynurenine Pathway Activation. **Brain, Behaviour, and Immunity**, v. 26, n. 6, p. 979-87, 2012.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673–689, 2015.

IDRIS F., et al. Invasion of a murine in vitro blood-brain barrier co-culture model by dengue virus serotypes 1 to 4. **Archives of Virology**, vol. 164, n. 4, p. 1069-83, 2019.

JAHANGIRI, A. et al. Saa is found on apob-containing lipoproteins in obese diabetic humans. **Obesity**, v. 21, p. 993–6, 2013.

JAIN, S.S.; BIRD, R.P. Elevated expression of tumor necrosis factor-alpha signaling molecules in colonic tumors of zucker obese (fa/fa) rats. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 9, p. 2042–50, 2010.

JENKINS, T. A. et al. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. **Nutrients**, v. 8, n. 1, Jan. 20 2016.

KANDA, H. et al. MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration Into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, 2006.

KERN, P.A. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 95, n. 5, p. 2111–19, 1995.

KIM, C. Y. et al. Red ginseng-derived saponin fraction suppresses the obesity-induced inflammatory responses via Nrf2-HO-1 pathway in adipocyte-macrophage co-culture system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1507-16, 2019.

KIM, S. A.; LEE, E. K.; KUH, H. J. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 335, n. 2, p. 187–196, 2015.

KINTSCHER, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p. 1304-10, 2008.

KOIVULA, T. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity is associated with regulatory T cell response in acute Puumala hantavirus infection. **Pathogens and Diseases**, v. 75, n. 1, 2017.

KRCMOVA, L. et al. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan, and creatinine in human serum by high throughput HPLC. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1466-71, 2011.

KUSMINSKI, C. M. et al. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016.

LAZARIS-BRUNNER, G. et al. Tryptophan requirement in young adult women as determined by indicator amino acid oxidation with L-[13C]phenylalanine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 303–10, 1998.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 107–114, 2009.

LI, S. et al. Resveratrol inhibits lipogenesis of 3 T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial mass increase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1857, n. 6, p. 643–652, 2016

LILJA, H.E. et al. An adipoinductive role of inflammation in adipose tissue engineering: key factors in the early development of engineered soft tissues. **Stem Cells Development**, v. 22, n. 10, p.1602-13, 2013.

LIU, Z. et al. Diet-induced obesity elevates colonic TNF-alpha in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 1207–13, 2012.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, vol 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol. 461, p. 25-46, 1999.

MAHAN, D.C.; SHIELDS, R.G. Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 513–21, 1998.

MARKOWITZ, S. et al. Understanding the Relation Between Obesity and Depression: Causal Mechanisms and Implications for Treatment. **Clinical Psychology**, vol. 15, n. 1, p. 1-20, 2008.

MARTINSSON, A. Hypertrophy and hyperplasia of human adipose tissue in obesity. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 42, p.481-486, 1969.

McLEAN, I. C. et al. Powering ex vivo tissue models in microfluidic systems. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 10, p. 1399-1410, 2018.

MILANESCHI, Y. et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular Psychiatry**, vol. 24, p. 18-33, 2018.

MONZILLO, L. U. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance. **Obesity Research**, v. 11, n. 9, p. 1048-54, 2003.

MOON, H. S. et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. **Obesity**, v. 15, n. 11, p. 2571–2582, 2007.

MUNIESA-GONZÁLEZ, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, p. 1–18, 2017.

MUNIPALLY, P. K. et al. Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 117, n. 5, p. 254-8, 2011.

NAJFELD, V. et al. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase gene (INDO) to chromosome 8p12-->p11 by fluorescent in situ hybridization. **Cytogenetics And Cell Genetics**, v. 64, n. 3-4, p. 231-232, 1993.

NAKARAI, H. et al. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. **Innate Immunity**, v. 18, n. 1, p. 164–170, 2012.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, L. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol. 44, n. 3, p. 205-14, 2012.

NEWMAN, T. et al. The numbers behind obesity. 2017 <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319902.php> Acesso em: 11 Dez 2018.

NTAMBI, M. J.; KIM, Y.-C. Symposium: Adipocyte Function, Differentiation and Metabolism Regulation of Leptin Production in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 3127–3131, 2000.

O'CONNOR, J. C. et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4200-9, 2009.

ODEGAARD, J.; CHAWLA, A. Adipose Tissue Metabolism in the Obese. **The Scientist**, 2012.

ONYIKE, C.U. et al. Is obesity associated with major depression? Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **American Journal of Epidemiology**, vol. 158, n. 12, p. 1139-47, 2003.

ORIHUELA, Y. C. O. et al. High relative abundance of firmicutes and increased TNF- α levels correlate with obesity in children. **Salud publica de Mexico**, vol. 59, n. 1, 2017.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

OZKAN, Y. et al. Relation of kynurenine/tryptophan with immune and inflammatory markers in coronary artery disease. **Clinical Laboratory**, v. 60, n. 3, p. 391-6, 2014.

PAULS, S.D. et al. Anti-inflammatory effects of α -linolenic acid in M1-like macrophages are associated with enhanced production of oxylipins from α -linolenic and linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 57, p. 121-29, 2018.

PENIDO, A. Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos. **Agência de Saúde**, Julho, 2019. Disponível em: <
<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>> Acesso em: 25/05/2020.

PFALZER, A. C. et al. Interleukin-1 Signaling Mediates Obesity-Promoted Elevations in Inflammatory Cytokines, Wnt Activation, and Epithelial Proliferation in the Mouse Colon. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, n. 38, v. 10, p. 445–51, 2018.

POND, C. M. An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 51, p. 367-377, 1992.

POPKO, K. et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. **European Journal of Medical Research**, vol. 15, n. 2, p. 120-2, 2010.

PRICE, N. C.; NAIRN, J. Exploring proteins: a student's guide to experimental skills and methods. Oxford (Oxfordshire): Oxford University Press, 2009.

PRYADARSHINI, S. et al. Cortisol regulates immune and metabolic processes in murine adipocytes and macrophages through HTR2c and HTR5a serotonin receptors. **European Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 7, p. 483-492, 2018.

RAY, G. T. et al. The high price of depression: Family members' health conditions and health care costs. **General Hospital of Psychiatry**, v. 46, p. 79-87, May 2017. ISSN 0163-8343.

REZZOLA, S. et al. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 17, p. 429-42, 2014.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 12, p. 885–96, 2006.

ROSHICK, C. et al. Comparison of Gamma Interferon-Mediated Antichlamydial Defense Mechanisms in Human and Mouse Cells. **Infection and Immunity**, vol. 74, n. 1, p. 225–38, 2006.

ROSOLEN, D. et al. N-phenylmaleimides affect adipogenesis and present antitumor activity through reduction of FASN expression. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 258, p. 10-20, 2016.

ROTHMAN, S. S. Lessons from the living cell: the culture of science and the limits of reductionism. **New York: McGraw-Hill**, 2002.

ROURKE, R.W., et al. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 8, p. 978-90, 2009.

SAMAD, N. et al. Biomarkers in Drug Free Subjects With Depression : Correlation With Tryptophan. **Psychiatry Investigation**, v. 16, n. 12, p. 948-53, 2019.

SAWADOGO, M. L. et al. Marginal efficiency of free or protected crystalline L-tryptophan for tryptophan and protein accretion in early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1561–8, 1997.

SCHELBERT, K. B. Comorbidities of Obesity. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, vol. 36, n. 2, p. 271-85, 2009.

SCHMID, B. et al. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 4, p. 1073–1082, 2005.

SCHOETTL, T. et al. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, n. 211, 2018.

SHU-HUI, S. et al. Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 6, p. 1830–7, 2013.

SICHERI, R. et al. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 23, n. 7, p. 1721-7, 2007.

SILVA, K. R. et al. Human Adipose-Derived Stem Cells Spheroids as Tools for Drug Discovery and Development. **Adult Stem Cells: Recent Advances**, p. 1–14, 2005.

SONG, M. et al. Adipocyte-Derived Exosomes Carrying Sonic Hedgehog Mediate M1 Macrophage Polarization-Induced Insulin Resistance via Ptch and PI3K Pathways. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 1416-32, 2018.

SOUZA, S. C. et al. TNF- α Induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, n. 6, p. 1077–1086, 2003.

SUGANAMI, T. et al. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2062–2068, 2005.

SUGIMOTO, H. et al. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2611-6, 2006.

SWARDFAGER, W. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1560-6, 2009.

THUL, P. J. et al. A subcellular map of the human proteome. **Science**, v. 356, n. 6340, 2017.

TIMMERS, S. et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of Resveratrol (resVida™) supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*, v. 14, n. 5, p. 612-22, 2011.

TOURINO, M. C. et al. Tryptamine and dimethyltryptamine inhibit indoleamine 2,3 dioxygenase and increase the tumor-reactive effect of peripheral blood mononuclear cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 5, p. 361-4, 2013.

TRAN, T. T.; KAHN, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, p. 195-213, 2010.

TRAYHURN, P. et al. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, vol. 92, n. 3, p. 347-55, 2004.

TREMMEL, M. et al. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

TSIOTRA, P.C. et al. Circulating adipokines and mRNA expression in adipose tissue and the placenta in women with gestational diabetes mellitus. **Peptides**, v. 101, p. 157-66, 2018.

TYRRELL, J. et al. Using genetics to understand the causal influence of higher BMI on depression. **International Journal of Epidemiology**, 2018.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6, 2015.

VÉCSEI, L. et al. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. **Nature Reviews Drug Discovery**, 12, 64–82, 2013.

VIGNAIS, P. M.; VIGNAIS, P. *Discovering Life, Manufacturing Life: How the experimental method shaped life sciences.* Berlin: Springer, 2010.

VIGNAU, J. et al. Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in serum by HPLC with UV and fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, v. 18, n. 10, p. 872-4, 2004.

WANG, X. et al. Advances and Challenges for Neural Regeneration Research. **Neural Regeneration**, p. 401-410, 2015.

WHO. **World Health Organization**, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 14/05/2019.

WOLF, H. The Effect of Hormones and Vitamin B6 on Urinary Excretion of Metabolites of the Kynurenine Pathway. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 136, p. 11-87, 1974.

WOLOWCZUK, I. et al. Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. **American Journal of Physiology**, v. 303, p. 135-143, 2012.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, v. 2, p. 366-76, 2012.

WU, Z.; BUCHER, N. L. R.; FARMER, S. R. Induction of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ during the Conversion of 3T3 Fibroblasts into Adipocytes Is Mediated by C/EBP β , C/EBP δ , and Glucocorticoids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 8, p. 4128–4136, 1996.

XIAO, C. et al. A modified HPLC method improves the simultaneous determination of plasma kynurenine and tryptophan concentrations in patients following maintenance hemodialysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 4, p. 907-910, 2014.

YAMAZAKI, F. et al. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. **The Biochemical Journal**, v. 230, n. 3, p. 635-8, 1985.

YAO, Y. et al. Lipid-Lowering Effects and Intestinal Transport of Polyphenols Extract from Digested-Buckwheat in Caco-2/HepG2 Co-culture Models. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** [Epub ahead of print], 2020.

ZEBISCH, K. et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 425, n. 1, p. 88–90, 2012.

ZHANG, X. et al. Systemic inflammation mediates the detrimental effects of obesity on asthma control. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 43–50, 2018.

ZHANG, Y. et al. Coculture of hWJMSCs and pACs in Oriented Scaffold Enhances Hyaline Cartilage Regeneration In Vitro. **Stem Cells International**, vol. 7, p. 1-11, 2019.

ANEXOS

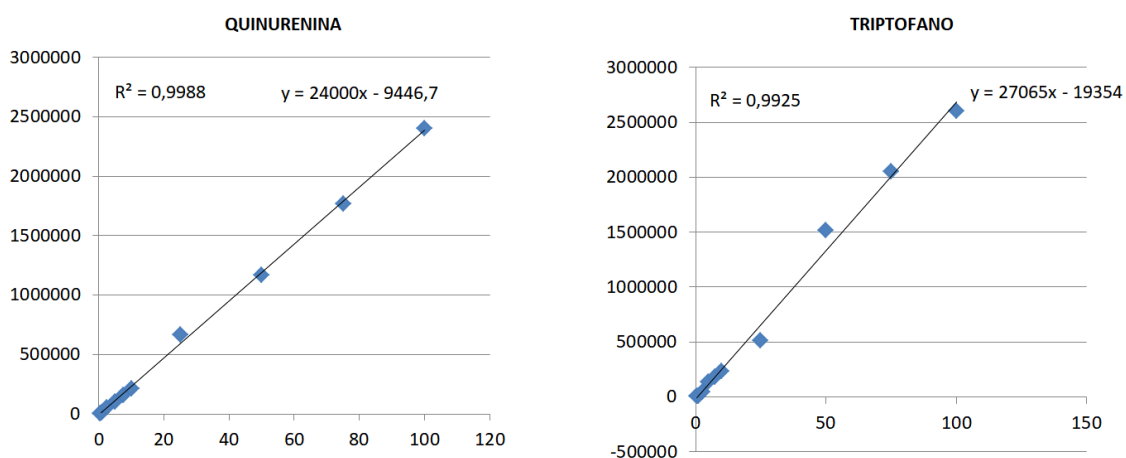
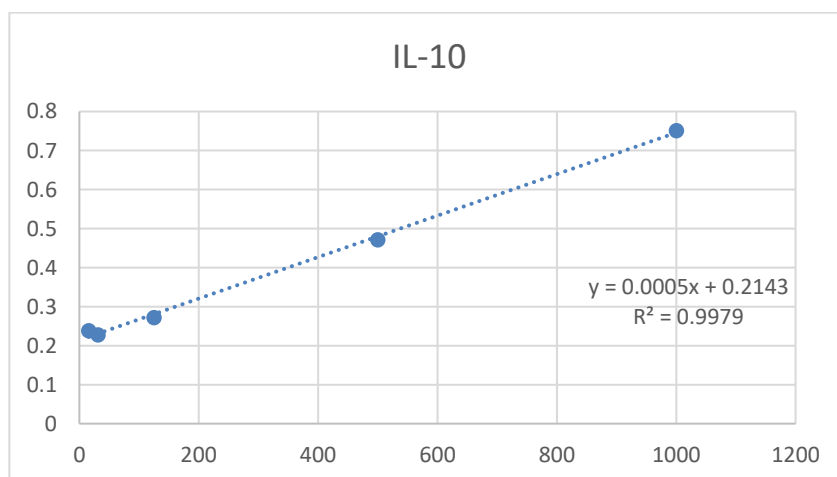
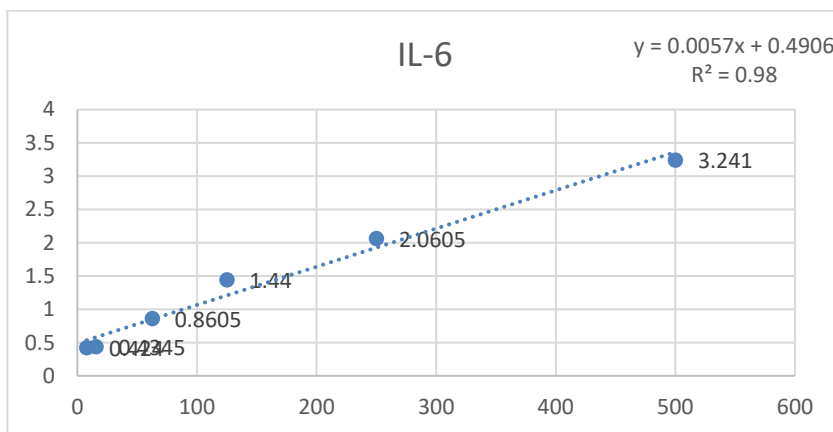
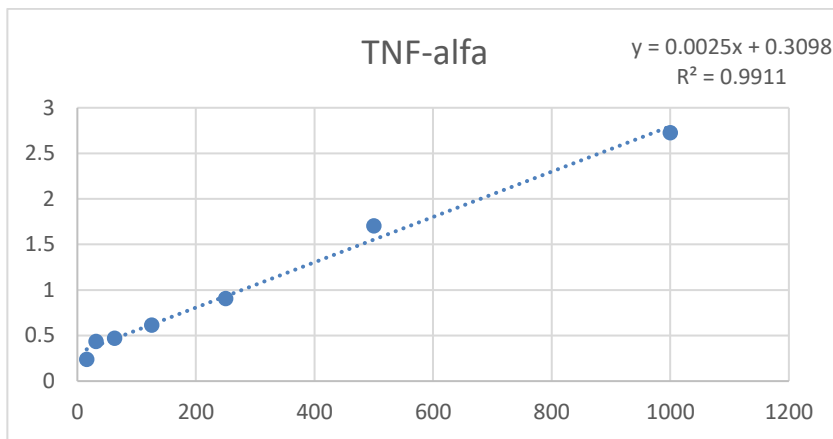
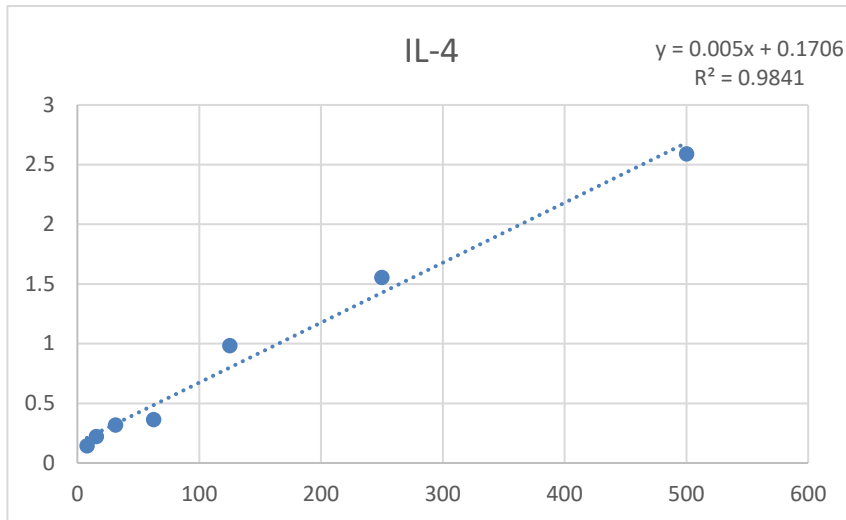
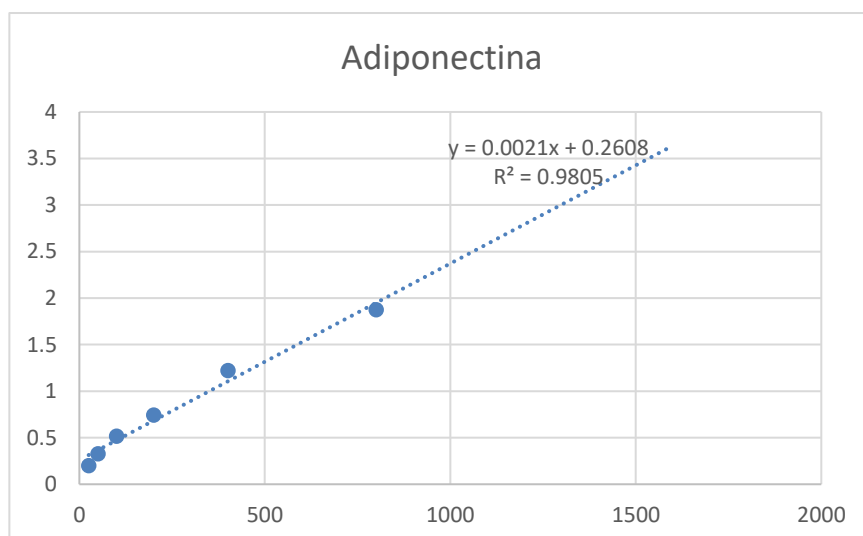


Figura X – Curva padrão das concentrações de quinurenina (esquerda) e triptofano (direita). O eixo Y representa os valores obtidos de absorbância, e o eixo X representa as concentrações dos compostos em mM. O valor de “y” na parte superior direita de cada gráfico representa a equação da reta para a curva de cada composto.

CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS







Leptina

