

# CARACTERIZAÇÃO DE ADIPÓCITOS DO TECIDO MARROM EM MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO

**Palavras-Chave:** MACRÓFAGOS, ADIPÓCITOS, TERMOGÊNESE

**Autores(as):**

SARAH CARDOSO MACHADO, IB – UNICAMP

Dr<sup>a</sup> ALINE SIQUEIRA-BERTI, IB – UNICAMP

ANTONIO THIAGO PEREIRA CAMPOS, FÍSICA - UFC

MARIA LUIZA CARREIRA LIMA, IB-UNICAMP

MARTA RODRIGUES DE SOUZA, IB - UNICAMP

Prof. Dr. HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO (orientador), IB - UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

Os macrófagos desempenham um papel importante em respostas imunes, na defesa, na inflamação, e são essenciais na manutenção da homeostase. O distúrbio de polarização dos macrófagos está envolvido em várias doenças patogênicas como câncer e diabetes. Essas células possuem uma ampla gama de fenótipos e podem variar de acordo com o tecido, localização e interação com outras células, como por exemplo, osteoclastos nos ossos, nos pulmões são macrófagos alveolares e no sistema nervoso células da microglia. Também possuem uma alta facilidade de se adaptar em diferentes condições, colaborando para sua diversidade funcional. Suas funções são reguladas por vias metabólicas e metabólitos, sendo ativados em resposta a uma inflamação, aumentando o metabolismo glicolítico e diminuindo a fosforilação oxidativa. Além disso, é responsável por regular a oxidação de ácidos graxos. (GENTEK R, 2014).

Os macrófagos podem ser divididos em diversas subpopulações, os mais estudados são os macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2). Os dois tipos possuem respostas inflamatórias e podem ser alterados devidos alguns fatores no microambiente tecidual. Os macrófagos classicamente ativados comumente chamados de macrófago pró inflamatórios, são ativados principalmente por INF- $\gamma$ , que funciona como uma sinalização para que a célula seja ativada e ajudam no combate de infecções. Já os macrófagos alternativamente ativados são descritos como macrófagos anti-inflamatórios ou regulatório. Os M2 são ativados por diferentes sinais como a Interleucina 4 que é secretada e também produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  contribuindo na melhora da inflamação e na reparação do tecido. (SHAPOURI-MOGHADDAM, 2018).

A ativação do tecido adiposo marrom (BAT) é muito estudado para tratamentos de obesidade devido às suas propriedades termogênicas decorrentes de sua capacidade de transportar energia através da proteína desacopladora 1 (Ucp1). Além disso, estudos mostram como a atividade do BAT e do tecido adiposo branco (WAT) pode ser modulada para aumentar a expressão de proteínas termogênicas (PRAPAHARAN, 2024).

As interações entre macrófagos e adipócitos no tecido adiposo são críticas para a regulação do metabolismo energético e obesidade. A polarização de macrófagos induzida por frio ou outros estímulos pode impulsionar a reprogramação metabólica de adipócitos, escurecimento e termogênese (ZHANG, 2024). Essa termogênese na gordura marrom pode estar correlacionada com variáveis inflamatórias. Ao inibir o recrutamento excessivo de células inflamatórias no WAT e promover a atividade termogênica do BAT, o receptor de quimiocina do adipócito 4 previne o desenvolvimento da obesidade (YAO, 2014). Contudo, o objetivo desse trabalho é observar a interação entre as células adiposas do tecido marrom em um microambiente inflamatório com macrófagos classicamente ativados, identificação lipídica através da técnica de CARS e o funcionamento do metabolismo após essa interação.

## **METODOLOGIA:**

### **CÉLULAS UTILIZADAS**

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram adquiridas do BCRJ (Banco de células do Rio de Janeiro) ou recebidas por doação de colaboradores. As células RAW 264.7 (macrófagos) foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta glicose, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina. As células 9B (pré-adipócitos) foram cultivadas com meio de cultura DMEM com alta glicose, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina. Todas as células cultivadas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> A 37°C de acordo com as recomendações da ATCC.

### **DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM ADIPÓCITOS**

Os pré-adipócitos 9B, extraídos de tecido marrom de camundongos, foram tratados por 8 dias com 3 diferentes tratamentos. O tratamento foi iniciado no primeiro dia com as células já aderidas e com 100% de confluência, seguindo o protocolo abaixo:

- 2º dia, diluídos em meio DMEM alta glicose: 1µM/mL Dexametasona, 2 µM/mL IBMX, 0,1µM/mL T3, 1µM/mL Indometacina e 1µM/mL Rosiglitazone.
- 4º dia, diluídos em meio DMEM alta glicose: 20nM/mL Insulina, 0,1µM/mL T3, 1µM/mL Rosiglitazone e 1% penicilina/streptomicina.
- 6º dia, diluídos em meio DMEM alta glicose: 20nM/mL Insulina, 1% penicilina/streptomicina.

No 8º dia iniciou os experimentos de cocultura.

### **COCULTURA CELULAR**

As células 9B depois de diferenciadas em adipócitos, foram plaqueadas e cultivadas por 24h em placas de 4 poços com fundo de lamínula, após esse período as células RAW 264.7 foram adicionadas na quantidade de ¼ na mesma placa e os tratamentos foram adicionados, 24h após, as

células foram fixadas. O tratamento utilizado foi 100ng/ml LPS e 20ng/ml IFN  $\gamma$  por 24 horas e células sem tratamento foram utilizadas como controle.

### **CARS**

Técnica CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) foi realizada utilizando um microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss invertido Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha). Para excitar as amostras biológicas, utilizou-se o sistema Chameleon Discovery NX (Coherent Inc., Santa Clara, Califórnia), que possui duas saídas de laser: um feixe de 100 fs/80 MHz sintonizável no comprimento de onda de 660 a 1320 nm, integrado com um pré-compensador de dispersão de velocidade de grupo (GDD), e outro feixe de 140 fs/80 MHz com comprimento de onda fixo em 1040 nm. O sinal CARS foi gerado na vibração de estiramento simétrico do grupo CH<sub>2</sub> (2840 cm<sup>-1</sup>), proporcionando imagens de lipídeos com alta seletividade química sem a necessidade de marcadores exógenos. Todas as imagens foram adquiridas com resolução espacial de 1024x1024 pixels (215x215  $\mu$ m) e zoom 2x, com duração por pixel de 3,15  $\mu$ s e tempo total de varredura de 7,75 s.

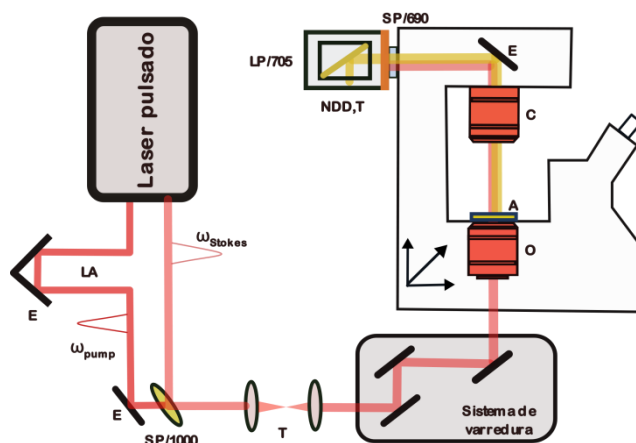


Figura 1- Sistema experimental. E: Espelho, T: Telescópio,  $\lambda/4$ : Placa de um quarto de onda, O: Objetiva, A: Amostra, C: Condensador, SP: ShortPass, BP: BandPass. LP: LongPass.

A Imagem FLIM foi excitada com potência de ~10mW na amostra, com comprimento de onda de excitação de 760nm, os sinais NAD(P)H e FAD foram obtidas simultaneamente e coletados por 120 segundos. O SPC image foi utilizado para análise do decaimento da fluorescência em cada imagem NAD(P)H e FAD.

### **FLIM**

A Imagem FLIM foi excitada com potência de ~10mW na amostra, com comprimento de onda de excitação de 760nm, os sinais NAD(P)H e FAD foram obtidas simultaneamente e coletados por 120 segundos. O SPC image foi utilizado para análise do decaimento da fluorescência em cada imagem NAD(P)H e FAD.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

As células 9B já diferenciadas em adipócitos foram submetidas em cocultura com as células RAW 264.7 e tratadas com LPS e IFN  $\gamma$ , após 24h as células foram submetidas à técnica de CARS em microscópio confocal que não é necessária coloração ao capturar as imagens. A capacidade de geração de imagens deste sistema de microscopia foi demonstrada capturando imagens dos lipídeos presentes nos adipócitos diferenciados em cultura.

Esse resultado nos mostrou a presença de gotículas de lipídios dentro das células 9B após o tratamento de 8 dias das células em cultura, independente da presença de macrófagos e do tratamento utilizado, confirmando um protocolo eficaz na diferenciação de adipócitos do tecido marrom.

Utilizamos as células RAW 264.7 em conjunto com as células adiposas do tecido marrom, tratadas com LPS e IFN  $\gamma$  e criamos um microambiente inflamatório com macrófagos classicamente

ativados, além disso, utilizamos macrófagos não polarizados como controle desse microambiente. Assim, esse resultado nos mostrou que as células RAW 264.7 após 24 horas em contato com as células adiposas passaram a expressar lipídios dentro do seu interior sugerindo a captura de vesículas contendo lipídios derivadas do adipócitos (Figura 2 A e B). Como já descrito, macrófagos associados a lipídios, podem capturar vesículas extracelulares que carregam lipídios danificados e mitocôndrias liberadas de adipócitos marrons extressados metabolicamente, sendo assim, durante a obesidade uma população de macrófagos foi identificada como principal responsável ao estresse metabólico do tecido e impulsionadores da perda de identidade dos adipócitos marrons (SCIARRETTA, 2024). Independente do estresse causado pelos macrófagos classicamente ativados às células adiposas foi observado também gotículas de lipídios nas células controle.

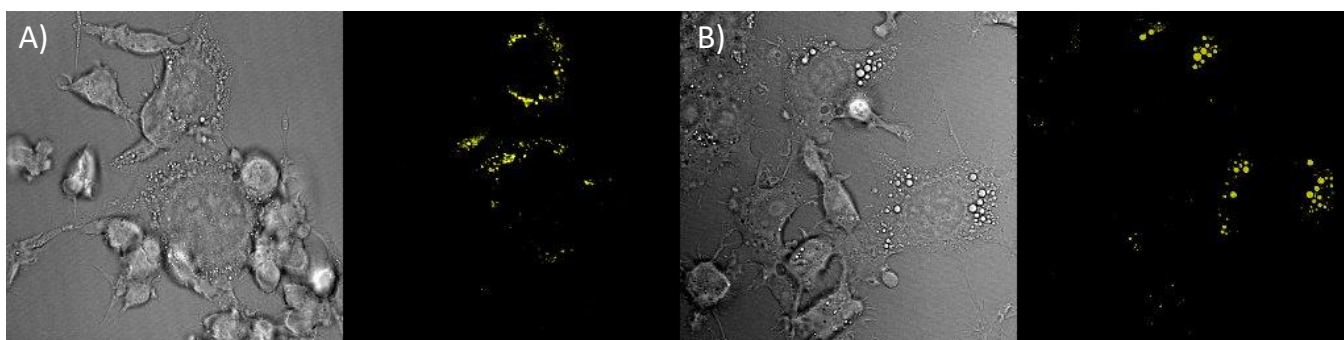


Figura 2: Interação das células RAW 264.7 e Adipócitos 9B. A) Grupo controle, sem tratamento, imagem campo claro e ao lado imagem CARS demonstrando gotículas de lipídios no interior dos adipócitos e dos macrófagos. B) Grupo tratado com LPS e  $\text{INF}\gamma$ , imagem campo claro e ao lado imagem CARS demonstrando as gotículas de lipídios no interior de ambas as células.

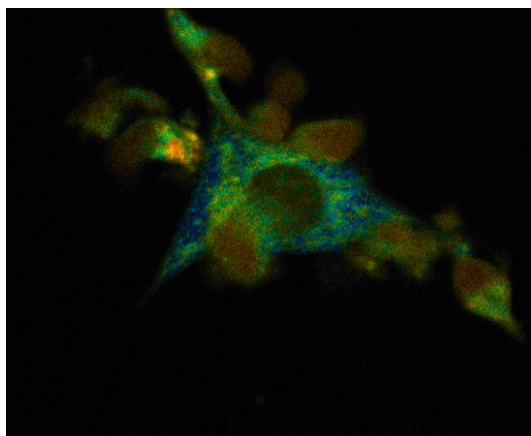


Figura 3: Detecção por FLIM do tempo de vida de NADH da interação entre adipócitos 9B e macrófagos RAW 264.7.

Estudos mostram que o tecido adiposo marrom é um tecido termogênico que desacopla a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e aumenta o gasto energético por meio da termogênese sem tremores em mamíferos (RAHMANI, 2024). Um experimento preliminar foi preparado para mostrar as diferenças metabólicas e mitocondriais e alteração do metabolismo das células adiposas e das células RAW 264.7 após interação em cocultura. Foi utilizada a técnica de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), capaz de fazer a aquisição de imagens de tempo de vida de fluorescência e através dela podemos

observar e mapear dados metabólicos celulares, porém esse experimento preliminar está sendo padronizado com as devidas condições e tratamentos ideais. Nesse resultado preliminar, podemos observar pela imagem a aquisição do tempo de vida de NADH em um grupo de macrófagos RAW 264.7 e células 9B diferenciadas (Figura 3). Experimentos futuros serão necessários para mostrar as

diferenças metabólicas das células adiposas após serem submetidas a um ambiente inflamatório na presença de macrófagos classicamente ativados.

## CONCLUSÕES:

Podemos concluir que macrófagos da linhagem RAW 264.7 captam lipídeos liberados pelas células 9B diferenciadas em adipócitos do tecido marrom e que ocorre independente do estresse celular causados pelos macrófagos classicamente ativados. Não foi possível observar os efeitos metabólicos causados às células adiposas no ambiente inflamatório com macrófagos, porém novos experimentos serão realizados.

---

## BIBLIOGRAFIA

- GENTEK R, MOLAWI K, SIEWEKE MH. **Tissuemacrophageidentityand self-renewal.** Immunol Rev. 2014 Nov;262(1):56-73.
- RAHMANI N, MOTAMEDI P, AMANI-SHALAMZARI S, ESCOBAR KA, SUZUKI K. **Swimming in cold water increases the browning process by diminishing the Myostatin pathway.** Mol Biol Rep. 2024 Aug 2;51(1):884.
- SCIARRETTA F, NINNI A, ZACCARIA F, CHIURCHIÙ V, et al. **Lipid-associated macrophages reshape BAT cell identity in obesity.** Cell Rep. 2024 Jul 23;43(7):114447.
- PRAPAHARAN B, LEA M, BEAUDRY JL. **Weighing in on the role of brown adipose tissue for treatment of obesity.** J Pharm Pharm Sci. 2024 Jul 17;27:13157.
- SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, TAGHADOSI M, ESMAEILI SA, MARDANI F, SEIFI B, MOHAMMADI A, AFSHARI JT, SAHEBKAR A. **Macrophageplasticity, polarization, andfunction in healthanddisease.** J CellPhysiol. 2018 Sep;233(9):6425-6440.
- YAO L, HEUSER-BAKER J, HERLEA-PANA O, ZHANG N, SZWEDA LI, GRIFFIN TM, et al. **Deficiency in adipocyte chemokine receptor CXCR4 exacerbates obesity and compromises thermoregulatory responses of brown adipose tissue in a mouse model of diet-induced obesity.** Faseb J. (2014) 28:4534–50.
- ZHANG Y, ZHANG B, SUN X. **The molecular mechanism of macrophage-adipocyte crosstalk in maintaining energy homeostasis.** Front Immunol. 2024 Apr 8;15:1378202.