

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

ANA LUIZA GONÇALVES VALGAS

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA IN VITRO POTENCIALIZA A SINERGIA
ENTRE LINFÓCITOS B-1 E MACRÓFAGOS E AUMENTA A VIABILIDADE
CELULAR**

SÃO PAULO

2024

ANA LUIZA GONÇALVES VALGAS

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA IN VITRO POTENCIALIZA A SINERGIA
ENTRE LINFÓCITOS B-1 E MACRÓFAGOS E AUMENTA A VIABILIDADE
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof.^a Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

SÃO PAULO

2024

Valgas, Ana Luiza Gonçalves.

Reprogramação metabólica *in vitro* potencializa a sinergia entre linfócitos B-1 e macrófagos e aumenta a viabilidade celular / Ana Luiza Gonçalves Valgas. - 2024.

44 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Patologia Experimental em Imunologia e Biologia Celular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

1. Citocinas. 2. Linfócitos B-1. 3. Macrófagos. 4. Sinergia.
5. Metabolismo. I. Saraiva, Anuska Marcelino Alvares (orientadora).
II. Título.

ANA LUIZA GONÇALVES VALGAS

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA IN VITRO POTENCIALIZA A SINERGIA
ENTRE LINFÓCITOS B-1 E MACRÓFAGOS E AUMENTA A VIABILIDADE
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

_____/_____/____/____/____

Prof.^a Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/____/____/____

Prof.^a Dra. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/____/____/____

Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni
Instituto Butantan

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

*Ricardo Reis
(Fernando Pessoa)*

AGRADECIMENTOS

Começo este trabalho agradecendo a todos que me acompanharam e apoiaram durante a jornada do mestrado. Primeiramente agradeço aos meus pais, Agnaldo e Roberta, por sempre me apoiarem nos estudos, permitindo que eu chegasse até a pós-graduação e me dedicasse integralmente.

Agradeço também ao Lucas, meu namorado, que me apoia incondicionalmente e acalma as minhas tempestades. Sem ele esta jornada não seria possível.

Agradeço à minha psicóloga por me ajudar a manter o controle emocional e a lidar da melhor forma possível com os empecilhos que surgiram em meu caminho.

Minha gratidão aos colegas da pós-graduação, pois compartilhamos inseguranças, angústias, medos, conquistas e conhecimento. A caminhada foi mais leve ao lado de vocês.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Anuska, por todo o apoio, ensinamentos, paciência e parceria desde a Iniciação Científica.

E agradeço a CAPES pela bolsa, permitindo minha dedicação integral.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha avó, Mary, por todo carinho e amor ao longo da minha vida. E ao meu avô, José Roberto, que me guia e olha por mim lá de cima. Sem vocês dois, eu nada seria.

O artigo será submetido à *Frontiers in Immunology*

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA IN VITRO POTENCIALIZA A SINERGIA
ENTRE LINFÓCITOS B-1 E MACRÓFAGOS E AUMENTA A VIABILIDADE
CELULAR**

Ana Luiza Gonçalves Valgas^{1*}, Beatriz Bezerra de Lima¹, Caio Omori Del Debbio Pinheiro¹, Elizabeth Christina Perez Hurtado¹, Rodrigo Augusto Foganholi da Silva¹, Maria Anete Lallo¹, Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni², Rui Curi³ e Anuska Marcelino Alvares-Saraiva¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Centro de Pesquisa, Universidade Paulista - UNIP, Campus Indianópolis, São Paulo - SP, Brasil.

² Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo - SP, Brasil.

³ Instituto de Ciências da Atividade Física e Esporte, Pós Graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL, Campus Liberdade, São Paulo - SP, Brasil.

*** Contato:**

Ana Luiza Gonçalves Valgas

analuzagvalgas@gmail.com

Palavras-chave: Metabolismo, Linfócitos B-1, Macrófagos, Citocinas e Sinergia.

RESUMO

A Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica responsável por milhões de mortes anualmente e, apesar de existir tratamento, permanece ainda sem cura, incentivando diversos estudos, especialmente no âmbito das terapias celulares. A partir da descoberta de que linfócitos B-1 são capazes de produzir insulina e regular a glicemia de camundongos diabéticos, nosso grupo de pesquisa busca meios de viabilizar uma terapia celular a partir dessas células. Dentre os desafios encontrados está a necessidade de co-cultivar os linfócitos B-1 com macrófagos para sua sobrevivência. Inicialmente, estudos mostraram que a IL-6 era responsável por essa dependência, porém temos observado maior sobrevivência de linfócitos B-1 submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM) para diferenciação em células produtoras de insulina, mas ainda dependente da presença de macrófagos. Deste modo, no presente trabalho buscamos compreender a influência do protocolo para RM na produção de citocinas e no metabolismo de glicose por macrófagos em culturas de células peritoneais aderentes. Para tanto, foi cultivada a porção aderente de células do lavado peritoneal e, as culturas, submetidas à RM, a partir do cultivo das células em meio suplementado com crotoxina, altas concentrações de glicose e nicotinamida. Após, foram avaliados os macrófagos em relação à captação e metabolismo da glicose, expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e produção de citocinas, além da quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas. Os achados revelaram que nos momentos iniciais da cultura, quando as células foram tratadas com glicose e crotoxina, foi observado ao longo de 72 horas, aumento das citocinas IL-12 e IFN- γ mas também IL-10. Em comparação com o controle, os níveis de TNF- α , MCP-1 e IL-6 estavam mais baixos. Aos 6 dias, sem crotoxina, com nicotinamida e 30mM de glicose, também foi observado menores níveis de IL-6 e TNF- α . Já a expressão genética relativa demonstrou cerca de 3x mais expressão de IL-6 no grupo do protocolo que no controle. Não houve diferença na expressão dos genes sinalizadores da via de produção de citocinas, o MyD88 e o NF κ B. A tendência ao aumento da expressão gênica de IL-6 associado aos níveis diminuídos dessa citocina nas culturas, nos fez investigar em linfócitos B-1 a expressão dos genes associados ao consumo dessa citocina. No grupo submetido ao protocolo houve tendência à maior expressão do receptor de IL-6 e STAT3. Ainda, houve aumento da viabilidade e diminuição da apoptose em macrófagos presentes no co-cultivo quando submetidos à RM. Embora a captação de glicose pareceu estar

diminuída, assim como a expressão de Glut-1, a atividade máxima das enzimas associadas à glicólise aumentou após o protocolo, enquanto foi observada uma tendência à diminuição da atividade enzimática associada à via das pentoses. Também, todos os genes avaliados associados à via glicolítica ou lipolítica estavam modulados negativamente nos macrófagos reprogramados. Em conclusão, o protocolo de RM direcionado à produção de insulina por linfócitos B-1 afeta também o metabolismo e o perfil inflamatório dos macrófagos, também presentes na cultura, revelando características de macrófagos M2, mais anti-inflamatório. No entanto, a expressão gênica contrapõe esses achados. A expressão diminuída de Glut-1 corrobora com a menor captação de glicose observada, embora a atividade máxima enzimática sugere aumento da via glicolítica clássica. Os resultados, em qualquer momento avaliado, indicam maior produção de IL-6 por macrófagos reprogramados metabolicamente e provável consumo dessa citocina por linfócitos B-1. Em conjunto, esses resultados auxiliam na compreensão da sinergia entre macrófagos e linfócitos B-1 e reforçam a importância da IL-6 para a sobrevivência do linfócito, fato que auxiliará os estudos que visam o estabelecimento da terapia celular para o controle da DM a partir de linfócitos B-1.

IN VITRO METABOLIC REPROGRAMMING ENHANCES B-1 LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES SYNERGY AND INCREASES THE CELL VIABILITY

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease responsible for millions of deaths annually and, despite the existence of treatment, there is still no cure, encouraging several studies, especially in the field of cell therapies. After discovering that B-1 lymphocytes are capable of producing insulin and regulating blood glucose levels in diabetic mice, our research group has been seeking ways to enable cell therapy using these cells. Among the challenges encountered is the need to co-culture B-1 lymphocytes with macrophages for their survival. Initially, studies demonstrated that IL-6 was responsible for this dependence, but we observed greater survival of B-1 lymphocytes subjected to the metabolic reprogramming (MR) protocol for differentiation into insulin-producing cells, but still dependent on the presence of macrophages. Thus, in the present study we aim to understand the influence of the MR protocol on cytokine production and glucose metabolism by macrophages in adherent peritoneal cell cultures. For this purpose, the adherent portion of cells from peritoneal lavage was cultured, and the cultures were requested for MR, by cultivating cells in crotoxin, high concentrations of glucose and nicotinamide supplemented medium. Afterwards, the macrophages were evaluated to glucose uptake and metabolism, also glucose metabolism and cytokine production genes expression and to cytokines amount into the culture supernatant. The results revealed in the early culture, when the cells were treated with glucose and crotoxin, an increase in the cytokines IL-12 and IFN- γ but also IL-10 were observed over 72 hours. Compared to the control, the levels of TNF- α , MCP-1 and IL-6 were decreased. On day 6th, without crotoxin and with nicotinamide and High Glucose 30 mM, decreased levels of IL-6 and TNF- α were also noticed. Relative gene expression demonstrated approximately 3 times more expression of IL-6 gene in the MR group than in the control group. There was no difference in the expression of the cytokine production signaling pathway genes MyD88 and NF κ B. The tendency for increased IL-6 gene expression associated with decreased levels of this cytokine in cultures led us to investigate the expression of genes associated with the consumption of this cytokine in B-1 lymphocytes. In the MR group there was a tendency for increased expression of the IL-6 receptor and STAT3.

Also, there was an increase in the viability and decrease in apoptosis in macrophages present in the co-culture when subjected to MR. Although glucose uptake was decreased, as well as the expression of Glut-1, the maximum activity of enzymes associated with glycolysis increased after the MR, while a tendency for decreased enzymatic activity associated with the pentose pathway was observed. Furthermore, all genes evaluated associated with the glycolytic or lipolytic pathway had modulated levels in reprogrammed macrophages. In conclusion, the MR protocol targeting insulin production by B-1 lymphocytes also affects the metabolism and inflammatory profile of macrophages, also present in the culture, revealing characteristics of M2 macrophages, which are more anti-inflammatory. However, gene expression contradicts these findings. The decreased expression of Glut-1 corroborates the lower glucose uptake observed, although the maximum enzymatic activity suggests an increase in the classical glycolytic pathway. The results, at any time evaluated, indicate greater production of IL-6 by metabolically reprogrammed macrophages and probable consumption of this cytokine by B-1 lymphocytes. Together, these results help to understand the synergy between macrophages and B-1 lymphocytes and reinforce the importance of IL-6 for lymphocyte survival, a fact that will support studies aiming at establishing cell therapy to control DM using B-1 lymphocytes.

Key-words: Metabolism, B-1 lymphocytes, Macrophages, Cytokines and synergy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Delineamento experimental	17
2.2. Animais	17
2.2.1. Coleta das células peritoneais	18
2.3. Protocolo de Reprogramação Metabólica	18
2.4. Teste de Viabilidade e morte celular	18
2.5. Captação de Glicose	19
2.6. Determinação da Atividade Máxima de Enzimas	19
2.6.1. Hexoquinase (EC 2.7.1.1)	20
2.6.2. Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)	20
2.6.3. Citrato Sintase (EC 4.1.3.7)	20
2.6.4. 6-Fosfofrutoquinase (EC 2.7)	21
2.6.5. Piruvato quinase (EC 2.7.1.40)	21
2.6.6. Carnitina Palmitoil Transferase	21
2.6.7. Determinação da concentração de proteínas	21
2.6.8. Cálculo e Expressão dos Resultados	22
2.7. Extração de RNA e confecção de cDNA para análise de expressão gênica por qPCR	22
2.8. Avaliação do metabolismo pela expressão dos genes Hexoquinase, Glut-1, Fosfofrutoquinase e Carnitina palmitoil transferase 1	23
2.9. Avaliação da expressão relativa dos genes relacionados à produção de citocinas da Interleucina-6, Interleucina-10, Interleucina-12 e TNF- α , Arginase 1, MyD88 e NF κ B em Macrófagos e expressão da IL-10, STAT3 e do receptor de IL-6 em Linfócitos B-1	23
2.10. Cinética de Citocinas	24
2.11. Análise estatística	25
3. RESULTADOS	25
3.1. Cinética de Citocinas	25
3.2. Avaliação da Produção de Citocinas pela Expressão Relativa dos Genes de IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , Arginase 1 em Macrófagos	27
3.3. Avaliação da produção e consumo de IL-6 pela expressão relativa de genes associados à produção de citocinas nos macrófagos e consumo de IL-6 e Produção de IL-10 por linfócitos B-1	28
3.4. Viabilidade dos Macrófagos	30
3.5. Uptake de Glicose	30
3.6. Avaliação do metabolismo pela expressão relativa dos genes de Glut-1, Hexoquinase, Fosfofrutoquinase, Carnitina Palmitoil Transferase e Atividade Enzimática	31
4. DISCUSSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	38
MATERIAL SUPLEMENTAR	44

1. INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida como a doença causada pelo excesso de açúcar, a Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica causada pela deficiência na produção ou resistência à insulina. Este distúrbio metabólico afeta cerca de 830 milhões de pessoas no mundo inteiro e 59% dos adultos diagnosticados, vivem sem medicações para o controle glicêmico. Aproximadamente 6,7 milhões de mortes no mundo em 2021 foram atribuídas a essa doença crônica e sem cura que está classificada em diferentes tipos: tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional, entre outros tipos mais recentemente descritos.^{1 2}

A DM tipo 2 é a mais frequente, cerca de 90% a 95% dos diagnósticos e caracteriza-se pelo aumento nos níveis de glicose no sangue devido ao surgimento de resistência à insulina e/ou quando o pâncreas não produz insulina o suficiente para o corpo. No entanto, a DM tipo 2 pode ser prevenida com bons hábitos de saúde, incluindo boa alimentação e a prática de atividade física. Por outro lado, a DM tipo 1 não pode ser prevenida, sendo causada por fatores genéticos ou não, mas principalmente pela destruição de células β pancreáticas causada pelo sistema imune.³

Apesar de existirem medicamentos efetivos para o controle da DM e o monitoramento dos níveis de glicose no sangue, facilitando o controle glicêmico pelos portadores da doença, a DM segue sem uma cura, motivando diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo a focar na melhoria de tratamentos e na busca pela cura dessa doença, sendo os métodos de terapia celular um dos meios mais empregados na busca de resultados no controle de níveis glicêmicos.⁴

Há uma grande quantidade de estudos utilizando o transplante de ilhotas pancreáticas, assim como estudos com células-tronco para regenerar o tecido pancreático em casos de DM tipo 1, como sugere o artigo de Altaba e Bulum (2024). Em contrapartida, há menos relatos na literatura sobre o uso de imunomodulação e o uso de células imunes para terapia celular e controle efetivo de ambos os tipos da DM.^{4 5 6} Neste sentido, em 2015 foi descoberta a capacidade intrínseca dos linfócitos B-1 produzirem insulina e, desde então, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando num protocolo de reprogramação metabólica (RM) capaz de melhorar as condições de proliferação e sobrevivência dos linfócitos B-1 *in vitro*, mantendo sua capacidade de produzir insulina.⁷

No entanto, uma importante limitação da cultura de células B-1 é sua baixa sobrevivência em monocultivos. E, apesar do protocolo de RM melhorar essa condição, ainda é preciso que as células B-1 sejam co-cultivadas com macrófagos peritoneais para o sucesso da cultura.

Sabe-se que as células B-1 interagem com as outras células do sistema imune e causam reações modificadoras. No caso da DM, os linfócitos B-1 modulam a infiltração de células T no pâncreas. Já outro estudo demonstrou que as células B-1 induzem a diferenciação de linfócitos T CD4+ para o subtipo Th17 pró-inflamatórias¹⁶ ou permitem que as células T CD8+ se infiltrem ao invés do linfócito T auxiliar. Outro papel conhecido das células B-1 é a regulação das funções dos macrófagos. Popi *et al.*¹⁷ demonstraram que a Interleucina (IL)-10 secretada por células B-1 diminui a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, o que reduz significativamente sua capacidade fagocitária *in vitro*.

Os linfócitos B-1 juntamente com os macrófagos peritoneais, quando cultivados aderem à placa, caracterizando assim a porção de células peritoneais aderentes. Originários de monócitos sanguíneos, os macrófagos são células que apresentam populações e funções diversificadas que variam de acordo com a localização no organismo.¹⁸ São pertencentes ao sistema imune, possuem grande capacidade fagocitária, funções pró e anti-inflamatórias, além de secretar diversas moléculas que influenciam funções locais e sistêmicas.^{18 19} Devido à sua ampla heterogeneidade, os macrófagos são muito utilizados em estudos, principalmente pela diversidade de citocinas, enzimas, marcadores de superfícies, quimiocinas e fatores de crescimento secretados.¹⁹ Essa capacidade secretória dos macrófagos pode ser alterada de acordo com o ambiente em que a célula está inserida, além de influenciar as atividades de linfócitos T e B e, até mesmo, a captação de insulina por adipócitos em inflamação crônicas devido à obesidade.^{19 20}

Com o conhecimento de que as células B-1 regulam algumas funções dos macrófagos, o estudo de Thies *et al.* analisou o efeito oposto, se a presença de macrófagos altera a população de células B-1. As células B-1 foram cultivadas sozinhas e com macrófagos para observar a proliferação e viabilidade. Das células cultivadas sozinhas 67,4% eram viáveis, e 91,4% das células cultivadas com macrófagos eram viáveis.²¹ Para saber se o aumento observado da viabilidade das células B-1 cultivadas com macrófagos se devia ao contato célula-célula ou era mediado por algum fator solúvel foi feita uma cultura das células B-1 sem contato

direto com macrófagos. O resultado do experimento confirmou a existência de um fator solúvel que auxilia as células B-1 e cria a sinergia com os macrófagos.²¹ Após testes, a IL-6 foi reconhecida como o fator que viabiliza as células B-1 *in vitro*. Mas o que enquadra os macrófagos como essenciais para a produção do fator IL-6 é resultado dos experimentos feitos por Thies *et al.*, as células B-1 foram expostas ao co-cultivo com macrófagos IL-6 KO (incapazes de secretar essa citocina), o que diminuiu substancialmente as concentrações da IL-6 na cultura e, conseqüentemente, reduziu diretamente a viabilidade das células B-1.²¹

A Interleucina-6 é uma citocina com uma grande gama de funções no organismo, é produzida por células linfoides, em destaque os linfócitos T e B, e não linfoides, como os macrófagos e células dendríticas. A IL-6 é reconhecida pelo seu papel pró-inflamatório durante a fase aguda de inflamação, mas também atua na hematopoiese, no crescimento de células tumorais e células T, além de auxiliá-las na diferenciação para células T citotóxicas.^{22 23 24 25} Ou seja, a IL-6 atua tanto em processos de patogênese, quanto em processos de homeostase do nosso organismo.²⁵

Em macrófagos, a produção de IL-6 é altamente estimulada por receptores *Toll-like*. A produção de citocinas pró-inflamatórias é realizada por meio da via NF κ B/P65 de ativação clássica, que se inicia por sinais inflamatórios (Citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas bacterianas) recebidos pelos receptores *toll-like* (TLR)1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13, encontrados na membrana celular.^{26 27}

Os estímulos recebidos pelos TLR levam a uma sinalização intracelular que induz a ativação de MyD88, uma proteína adaptadora e ancoradora presente no citoplasma das células, que capta a IRAK1 e IRAK4 (Proteína quinase associada a resposta de Interleucina). As IRAKs recrutam IKK, um complexo de proteínas quinase que vão fosforilar o I κ B (Inibidor κ B), liberando as subunidades heterodímeras do NF κ B (Fator Nuclear κ B), P50 e P65, no citoplasma que, posteriormente, migrarão para o núcleo celular, onde atuarão na regulação da expressão de genes relacionados à inibição de apoptose, quimiocinas, citocinas e mediadores de inflamação, como a IL-6.^{26 27 28 29 30 31}

Quanto ao consumo de IL-6 pelas células, é através de um sistema receptor que engloba a ação do Receptor de IL-6 (IL-6R) e da glicoproteína 130 (GP130). Este processo inicia-se pela ligação da IL-6 ao mIL-6R (Receptor de IL-6 ligado à membrana celular), que leva à homodimerização da GP130 e ao se ligar com o sIL-6

(Receptor de IL-6 solúvel) forma o complexo IL-6 - sIL-6R, que possui alta afinidade com a IL-6.³²

Este complexo, ativa as Janus Quinases (JAKs), que fosforilam a tirosina presente na região citoplasmática da GP130. A ativação da JAK induzida por GP130 e IL-6 incita duas vias de sinalização: a via SHP-2, que é derivada da GP130 proteína tirosina fosfatase-2 (Tyr759), da Quinase regulada por Sinal extracelular (ERK) e da Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).^{32 33} A segunda via, JAK/STAT (STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição) é mediada por GP130. A ativação das proteínas STATs desempenha um papel regulador na expressão de genes relacionados à proliferação e sobrevivência das células receptoras.^{32 33}

Portanto, no presente trabalho, investigamos a influência do protocolo elaborado para o estudo da terapia celular com linfócitos B-1, que inclui a adição de altas concentrações de glicose, crotoxina e nicotinamida, na produção e secreção de citocinas, bem como nas alterações metabólicas em macrófagos peritoneais co-cultivados com linfócitos B-1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

Foram cultivados e avaliados os macrófagos da porção aderente de células obtidas do lavado peritoneal. Eles foram cultivados em conjunto com as células B-1, também aderentes. As populações de células aderentes foram submetidas ao protocolo RM para a produção de insulina por células B-1, que consiste no cultivo das células em meio R10 (RPMI e 10% de SFB) suplementado com Crotoxina e High Glucose a 20mM por três dias. Então, foi realizada a troca para o meio R10 contendo Nicotinamida e High Glucose a 30mM. Após três dias foram avaliados os macrófagos em relação à captação de glicose, ao metabolismo da glicose e ácidos graxos, pela atividade máxima de enzimas e expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e produção de IL-6 pelas células alvo e, o sobrenadante das culturas foram avaliados quanto à dosagem de citocinas em diferentes tempos do cultivo. (Figura 1).

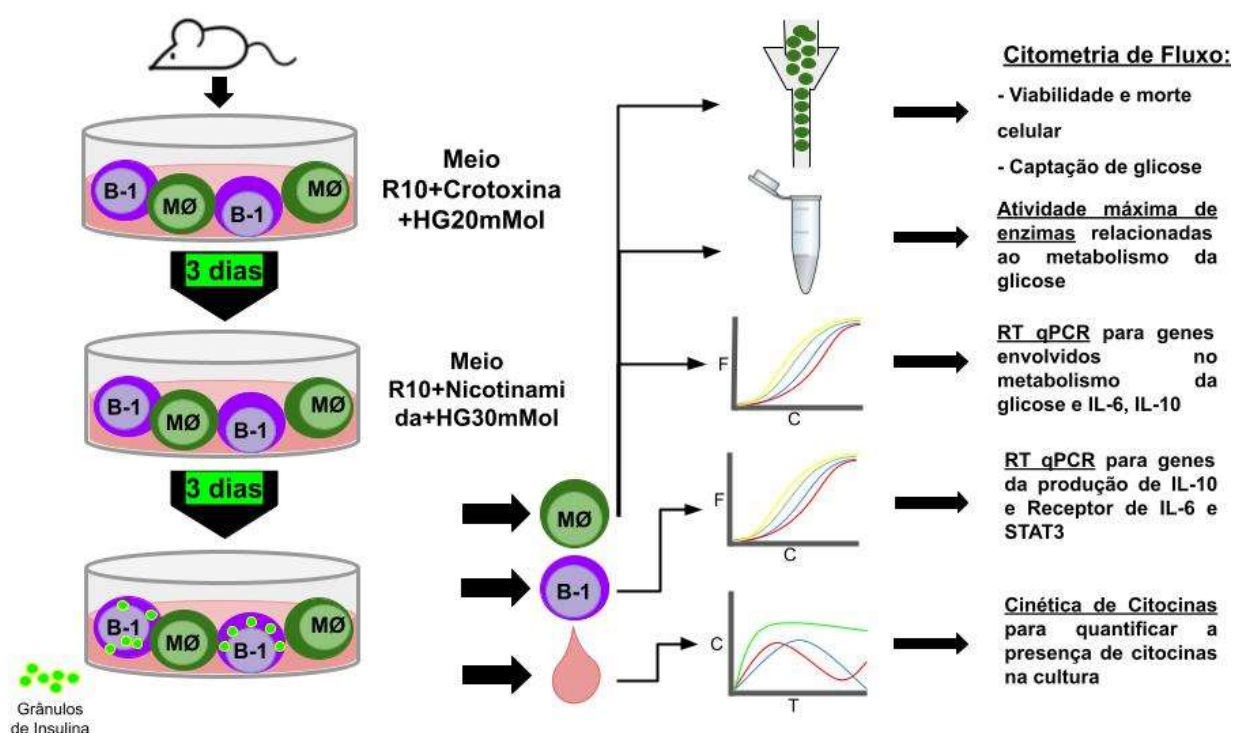


Figura 1: Delineamento experimental com a descrição das populações celulares cultivadas e a população avaliada.

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c de 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP São Paulo. Os animais foram mantidos no

Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, por um período de no mínimo dois dias, antes de serem utilizados nos experimentos, com livre acesso a água e ração. Os camundongos foram eutanasiados por meio do aprofundamento anestésico inalatório com Isoflurano. Todos os procedimentos experimentais aqui descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista sob o número 5290311023.

2.2.1. Coleta das células peritoneais

As células peritoneais de camundongos foram obtidas por lavagens sucessivas com 2 mL de meio RPMI (Sigma, St Louis, MO, USA) e cultivadas por 40 minutos, a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. Após a incubação, o sobrenadante, contendo as células não aderentes, foi recolhido e descartado. E então iniciado o protocolo RM.

2.3. Protocolo de Reprogramação Metabólica

Sobre as células aderentes foi acrescentado meio R10 (meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina e β-mercaptoetanol) contendo crotoxina (CTX) e 20mM de glicose (HG 20mM). Esses tratamentos são efetivos em promover a proliferação de células B-1 – fase de expansão (dados não publicados). No dia 3, o meio de cultura foi trocado por meio R10 contendo nicotinamida e 30mM de glicose (HG 30mM), utilizado para otimização da produção de insulina – Fase de diferenciação. No dia 6, os macrófagos foram coletados e avaliados conforme descrito nos próximos itens. Nas culturas de células peritoneais, as células B-1 se soltam da placa a partir do 3º dia de cultivo e passam a compor a porção suspensa. Essas células foram mantidas em co-cultivo durante todo o período experimental e, ao final do protocolo, foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para posterior avaliação da expressão de genes envolvidos na utilização da IL-6.

2.4. Teste de Viabilidade e morte celular

Foram plaqueadas 0,5 x 10⁶ células peritoneais aderentes em cada poço, em placas de 24 poços. A porção aderente, enriquecida em macrófagos, foi colhida após o 6º dia de cultura e submetida ao protocolo de marcação pelo PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen), para se determinar a viabilidade e mortalidade celular, bem como a incidência de apoptose, de acordo com as determinações do fabricante. Brevemente, as células foram lavadas com PBS para

remoção do meio de cultura e incubadas com 125µL do tampão de ligação de anexina contendo 1µL de 7AAD e 1µL de anexina por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após incubação, foi acrescentado o mesmo volume de tampão de ligação de anexina e as amostras lidas imediatamente em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences).

2.5. Captação de Glicose

Foram plaqueadas $0,5 \times 10^6$ células peritoneais aderentes em cada poço, em placas de 24 poços. As células foram estimuladas conforme previamente descrito. Então, a porção suspensa (enriquecida em células B-1) foi retirada da placa e os macrófagos avaliados para a captação de glicose por meio do *Glucose Uptake Cell-based Assay kit* (Cayman, Michigan, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O poço contendo os macrófagos foi lavado com PBS e, então, acrescido meio RPMI sem glicose (Gibco™) contendo um análogo fluorescente da glicose, o 2-NBDG, na concentração de 100µg/mL sobre os macrófagos e incubados por 2h. Após a incubação, a placa foi novamente lavada com PBS, as células foram removidas do poço e suspensas em 200µL de *Cell-based Assay Buffer*, contido no kit. Para exclusão das células mortas, foi acrescentado iodeto de propídio, também fornecido pelo kit, em todas as amostras, na proporção de 1:1000. A avaliação foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences).

2.6. Determinação da Atividade Máxima de Enzimas

1.10^6 macrófagos provenientes da cultura citada no item 3.1 foram armazenados em *pellet* celular, em freezer -80°C . As amostras foram ressuspensas em 300µL de tampão de extração contendo Tris 100mM, EDTA 2m, Triton 1% e inibidores de proteases e fosfatases, sonicadas para induzir o rompimento da membrana celular e permitir a liberação das enzimas do citosol da célula. Após este procedimento, os restos celulares foram centrifugados a 12000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante, mantido sempre em gelo, separado para os ensaios enzimáticos

2.6.1. Hexoquinase (EC 2.7.1.1)

É a enzima que catalisa a fosforilação da glicose, a primeira reação da via glicolítica. A atividade máxima da enzima, será determinada segundo método descrito

por Crabtree e Newsholme (1972), tem como base a proporção de NADPH formado. O meio de ensaio para a determinação consiste de Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 7,5 mM, EDTA 0,8 mM, KCl 1,5 mM, mercaptoetanol 4 mM, NADP⁺ 0,4 mM, ATP 2,5 mM, glicose 1 mM, creatina-fosfato 10mM, creatina quinase 1,8 U, glicose-6-fosfato desidrogenase 1,4 U, Triton X-100 1% (v/v), pH 7,5 ao qual foram adicionados 100µL do sobrenadante, em um volume total de 1 mL. O ensaio foi iniciado pela adição de glicose ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

2.6.2. Glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)

Responsável por catalisar a primeira reação da via das pentoses. A atividade máxima da enzima será avaliada pelo método descrito por Bergmeyer *et al.* (1954). O tampão de extração (pH 8,0) consiste em Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 7,5 mM, EDTA 1 mM, KCl e sulfato de magnésio 5 mM. O meio de ensaio utilizado é constituído por Tris-HCl 86 mM, MgCl₂ 6,9 mM, NADP⁺ 0,4 mM, glicose-6-fosfato 1,2 U, Triton X-100 1% (v/v), ao qual serão adicionadas 100µL de sobrenadante. O volume total do ensaio foi de 1 mL, pH 7,6. O ensaio será iniciado pela adição de glicose-6-fosfato ao meio e as determinações serão realizadas a 25° C, por 10 minutos, a 340 nm.

2.6.3. Citrato Sintase (EC 4.1.3.7)

A atividade da enzima foi determinada segundo Alp e colaboradores (1976) pela quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão de ensaio utilizado consiste em Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM. O tampão de extração (pH 7,4) é constituído de Tris-aminometano 50 mM, EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetilCoA 0,1mM, oxaloacetato 0,5 mM e Triton X-100 1% (v/v), ao qual foram adicionados 100 µL do sobrenadante. O volume total do ensaio foi de 1 mL e o pH 8,1. A reação iniciou pela adição de oxaloacetato ao meio e a leitura realizada a 25° C, em 10 minutos, e 412 nm.

2.6.4. 6-Fosfofrutoquinase (EC 2.7)

Enzima da via glicolítica que catalisa a transferência irreversível de um fosfato de ATP a glicose-6-fosfato. A atividade máxima foi determinada segundo descrito por Opie e Newsholme (1967). O meio de ensaio para a determinação consiste de Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 2 mM, EDTA 0,8 mM, KCl 5 mM, NADH 0,2 mM, ATP 1 mM, LDH 2 U, piruvato quinase 4 U, Triton X-100 1% (v/v), pH 7,5 ao qual foram adicionados

20µL do sobrenadante, em um volume total de 100 µL. O ensaio foi iniciado pela adição de F6P 3mM e fosfoenolpiruvato 2mM ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

2.6.5. Piruvato quinase (EC 2.7.1.40)

Enzima da via glicolítica que catalisa a transferência irreversível de um fosfato da fosfoenolpiruvato para o ADP, resultando em piruvato e ATP. A atividade máxima foi determinada segundo descrito por Opie e Newsholme (1967). O meio de ensaio para a determinação consiste de KHPO₄ 100 mM, MgCL₂ 10 mM, EDTA 0,8 mM, KCl 80 mM, NADH 0,17 mM, ADP 5 mM, LDH 9 U, Triton X-100 1% (v/v), pH 7,5 ao qual foram adicionados 20µL do sobrenadante, em um volume total de 100 µL. O ensaio iniciou pela adição de fosfoenolpiruvato 2mM ao meio e as determinações foram realizadas a 25°C, por 10 minutos, a 340 nm.

2.6.6. Carnitina Palmitoil Transferase

A atividade da enzima foi determinada segundo Bieber *et al.* 1972) e Zammit e Newsholme (1979). O tampão de ensaio consiste em 60mM Tris HCL; 1,5 mM EDTA; 0,25 mM DTNB; 0,035 mM palmitoyl-CoA; 1% triton x-100e 1,25 mM L-(-) carnitina ou 1,25 mM D-(+) carnitina, em pH: 8,0. O volume total do ensaio foi de 175µL de tampão de ensaio ao qual foi adicionado 25µL de homogenato/sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de carnitina e monitorada a 412 nm por espectrofotometria. A atividade da enzima foi calculada pela diferença do DTNB da reação com a L-(-) carnitina pela reação com a D-(+) carnitina.

2.6.7. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi determinada utilizando-se Micro BCA Kit conforme recomendações do fabricante. Brevemente, 25 partes do reagente MA, 24 partes do reagente MB e 1 parte do reagente MC formaram a *Work Solution* (WS). Para o ensaio, as amostras foram diluídas 80x em tampão TRIS/EDTA e 150µL foi adicionado, em duplicatas, à placa de 96 poços. A curva padrão foi elaborada a partir da solução estoque de albumina sérica bovina a 2mg/mL, considerando o intervalo de concentração de 0 a 200µg/mL e, também, 150µL de cada concentração foi acrescido à placa, também em duplicata, para posterior cálculo de concentração das amostras. Foi acrescido sobre as amostras e curva o reagente WS, no volume de 150µL, a placa incubada a 37°C por 2 horas e, após resfriamento em temperatura

ambiente por 10 minutos, lida em espectrofotômetro, a 562nm. A concentração de proteínas das amostras foi calculada com base na equação da reta gerada a partir da curva padrão. Os fatores de diluição foram considerados na correção do valor final.

2.6.8. Cálculo e Expressão dos Resultados

A atividade máxima das enzimas está expressa em nmol/min/mg de proteínas. Os cálculos da atividade máxima foram feitos conforme a equação:

$$\frac{\text{Abs/dt} \times \text{V.T.E.}}{\text{Coef. Extinção} \times \text{diluição da amostra}} \times \text{V.A.}$$

Onde: abs = diferença de absorvância; dt = tempo de análise; VTE = volume total do ensaio; VA = volume da amostra. Coeficiente de extinção para 340 nm = 6,22 (e = 6,22 nM⁻¹. mL⁻¹) e para 412 nm = 13,6 (e = 13,6 nM⁻¹, mL⁻¹).

2.7. Extração de RNA e confecção de cDNA para análise de expressão gênica por qPCR

Os macrófagos e os linfócitos B-1 foram coletados separadamente das culturas previamente descritas, centrifugados, lavados em PBS e submetidos a tampão de lise contido no kit Illustra RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e posteriormente, o RNA foi extraído seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi utilizado para a obtenção do cDNA com SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) de acordo com as orientações do fabricante.

2.8. Avaliação do metabolismo pela expressão dos genes Hexoquinase, Glut-1, Fosfofrutoquinase e Carnitina palmitoil transferase 1

Foram utilizadas sondas e primers Taqman™ pré-fabricados: Hk1 - Mm00439344_m1; Hk2 - Mm00443385_m1; Glut-1 Slc2a1 - Mm00441480_m1; Pfk1 - Mm00435587_m1; Pfk2 - Mm01309576_m1; Cpt1a - Mm01231183_m1; Cpt1b - Mm00487191_g1; Rplp0 ARBP - Mm00725448_s1; (Thermo Fisher Scientific). Os níveis de expressão gênica foram avaliados por qPCR usando TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM) (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, UK). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador QuantStudio™ 3 System (Applied Biosystems, Life Technology) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A expressão relativa foi calculada com base no valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que

os valores de Ct dos genes de interesse foram normalizados em relação aos Ct dos genes de referência ARBP (Proteína de Ligação à Região de Fixação) e UBC (Poliubiquitina-C), e a expressão relativa de cada gene foi calculada em relação à média dos controles R10.

2.9. Avaliação da expressão relativa dos genes relacionados à produção de citocinas da Interleucina-6, Interleucina-10, Interleucina-12 e TNF- α , Arginase 1, MyD88 e NF κ B em Macrófagos e expressão da IL-10, STAT3 e do receptor de IL-6 em Linfócitos B-1

Foram utilizados primers com as seguintes sequências:

<u>Sequência dos primers</u>		
Genes	Foward (5' - 3')	Reverse (3' - 5')
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
IL-12	GGAAGCACGGCAAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAAT GG
TNF- α	GAAAAGCAAGCAGCCAACCCA	CGGCTCATGCTTTCTGTGCTC
ARG1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	GATGTCCCTAATGACAGCTCCT
MyD88	GTTGTGTGTGTCCGACCGT	GTCAGAAACAACCACCACCATG C
NF κ B	CCAAAGAAGGACACGACAGAAT C	GGCAGGCTATTGCTCATCACA
IL-6R	TAACTCCGTATTCGCCACG	CCTGGCTGACAAGCCTGTTT
STAT3	CCCGTACCTGAAGACCAAGT	AGCGCGTGCAAACCTGTACCT
ARBP	AGCTGAAGCAAAGGAAGAGTCG GA	ACTTGGTTGCTTTGGCGGGATT AG
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG

Os níveis de expressão gênica foram avaliados por qPCR utilizando SYBR green master mix (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix - Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram realizadas em volume total de 10 μ L, sendo 5 μ L de

SYBR, 1µL de cada sequência *forward* e *reverse* de primers específicos supracitados na Tabela 1 (0,5µM), 1 ng de cDNA (1µL) e água ultrapura (DEPC). Os ciclos de amplificação foram realizados em StepOnePCR em tempo real (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A análise foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, apresentando como quantidades relativas do gene alvo usando ARBP (Proteína de Ligação à Região de Fixação) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como genes de referência. As amostras do grupo Controle foram utilizadas para relativização da expressão.

2.10. Cinética de Citocinas

Foram coletados 50µL do sobrenadante de cultura às 6, 18, 48 e 72 horas e aos 6 dias. O material coletado foi armazenado a -20°C até o momento da dosagem por meio do método *Cytometric Bead Array* (CBA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram medidos os níveis de TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-6, IL-12p70 e MCP-1.

O método se baseia na ligação de *beads*, com intensidade de fluorescência conhecidos, em citocinas solúveis. Resumidamente, 20µL dos sobrenadantes foram misturados com 20µL das beads de captura, conjugadas a APC e 20µL do reagente de detecção, conjugado a PE. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, protegidas da luz. Então, as *beads* ligadas às citocinas foram centrifugadas, lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas no mesmo tampão para a aquisição de dados em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences). A intensidade de fluorescência de APC indicou qual citocina está sendo detectada e a intensidade de fluorescência de PE indicou a quantidade de citocina presente. Os resultados foram analisados no programa FCAP Array 3.0 e expressos em pg/mL, a partir da curva padrão estabelecida para cada citocina.

2.11. Análise estatística

Para análise estatística, foi aplicado teste t de student com teste a posteriori de Mann-Whitney. Para a avaliação da presença de citocinas e comparar a concentração por tempo, foi utilizado o teste de variância de 2 vias *two-way ANOVA*, com pós teste de Bonferroni. Os valores foram apresentados como média das triplicatas biológicas ± erro padrão da média. A significância assumida foi de 95% de confiabilidade, com valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Cinética de Citocinas

Podemos identificar na Figura 2 a dosagem das citocinas no intervalo de 6, 18, 48 e 72 horas após o plaqueamento e início do protocolo. A concentração de IL-12 diminuiu no grupo Controle (R10) ao longo do tempo observado. Paralelamente, a concentração dessa citocina aumentou no grupo RM (Figura 2A). Os níveis de TNF- α aumentaram consideravelmente no grupo controle após 48 e 72 horas de cultivo, como observado na figura 9B e, embora no grupo Insulina também tenha sido observado aumento dessa citocina às 72 horas, os níveis encontrados foram 4x menores que no grupo Controle. Já na figura 2C, vemos que a concentração de IFN- γ diminuiu ao longo do tempo no grupo Controle enquanto aumentou às 72 horas de cultivo no grupo RM. A citocina MCP-1 apresentou concentrações maiores no grupo controle durante todo o período avaliado (Figura 2D). As concentrações de IL-10 diminuiram ao longo das horas observadas no grupo controle enquanto aumentou no grupo RM, especialmente após 72 horas (Figura 2E). Por último, a dosagem de IL-6 permaneceu maior no grupo submetido ao protocolo durante as primeiras 48 horas, e então, ao completar 72 horas de cultivo, o grupo controle apresentou aumento significativo da dosagem desta citocina em comparação aos tempos iniciais e em comparação ao grupo RM (Figura 2F).

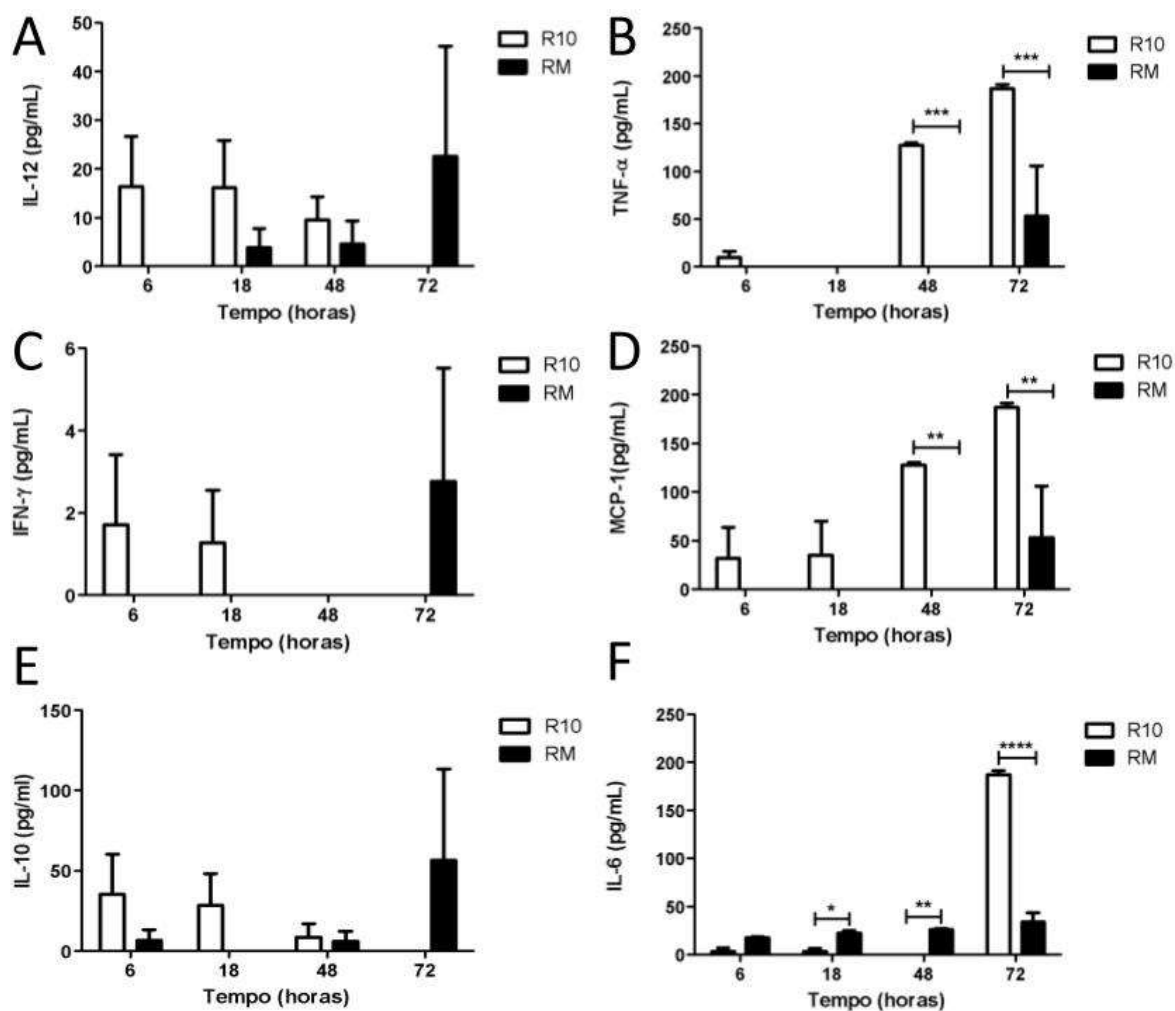


Figura 2: Dosagem de citocinas presentes no sobrenadante da cultura no intervalo de 6, 18, 48 e 72 horas após plaqueamento. Grupo Controle, cultivado apenas com R10 e grupo RM, cultivado com R10 contendo Crotoxina e HG20 mM por 3 dias e o meio foi trocado por R10 adicionado de Nicotinamida e HG30mM por mais 3 dias.

A figura 3 mostra os resultados da dosagem de citocinas após os 6 dias, ao final do protocolo RM para B-1 produtora de insulina. As citocinas detectadas no sobrenadante das culturas foram IL-6 e TNF- α . Os níveis tanto de IL-6 (Fig. 3A) quanto de TNF- α (Fig. 3B) no grupo submetido ao protocolo foram bem menores que os observados no grupo controle.

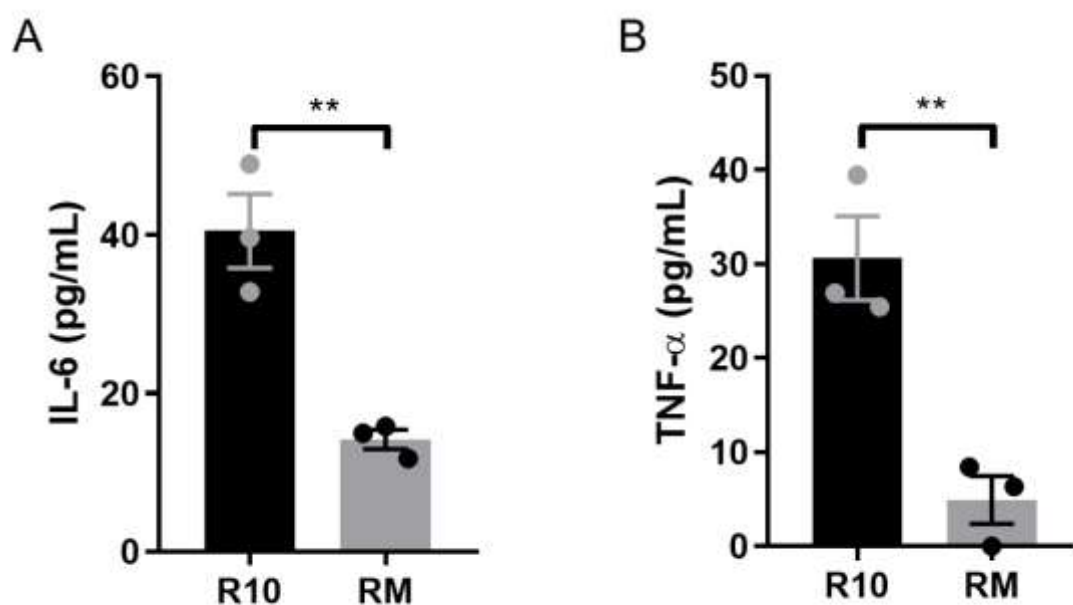


Figura 3: Análise da produção de citocinas pelo método CBA em sobrenadante de culturas de células peritoneais aderentes submetidas ao protocolo de RM em meio R10 contendo crotoxina e 20mM de glicose e após 3 dias o meio foi trocado para R10 com Nicotinamida e 30mM de glicose (Insulina) e amostras controles cultivadas com meio R10 (Controle). Teste t de student revelou ** $p < 0,01$.

3.2. Avaliação da Produção de Citocinas pela Expressão Relativa dos Genes de IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , Arginase 1 em Macrófagos.

Na figura 4A é possível observar que houve aumento da expressão relativa do gene de IL-6 no grupo de macrófagos submetido ao protocolo RM para células B-1 produtoras de insulina. Enquanto este grupo de macrófagos apresentou regulação negativa da expressão relativa do gene da IL - 10 (Fig. 4B). A expressão relativa dos genes de IL-12 (Fig. 4C), TNF- α (Fig. 4D) e Arginase 1 (Fig 4E) demonstraram tendência à diminuição quando as células são submetidas ao protocolo.

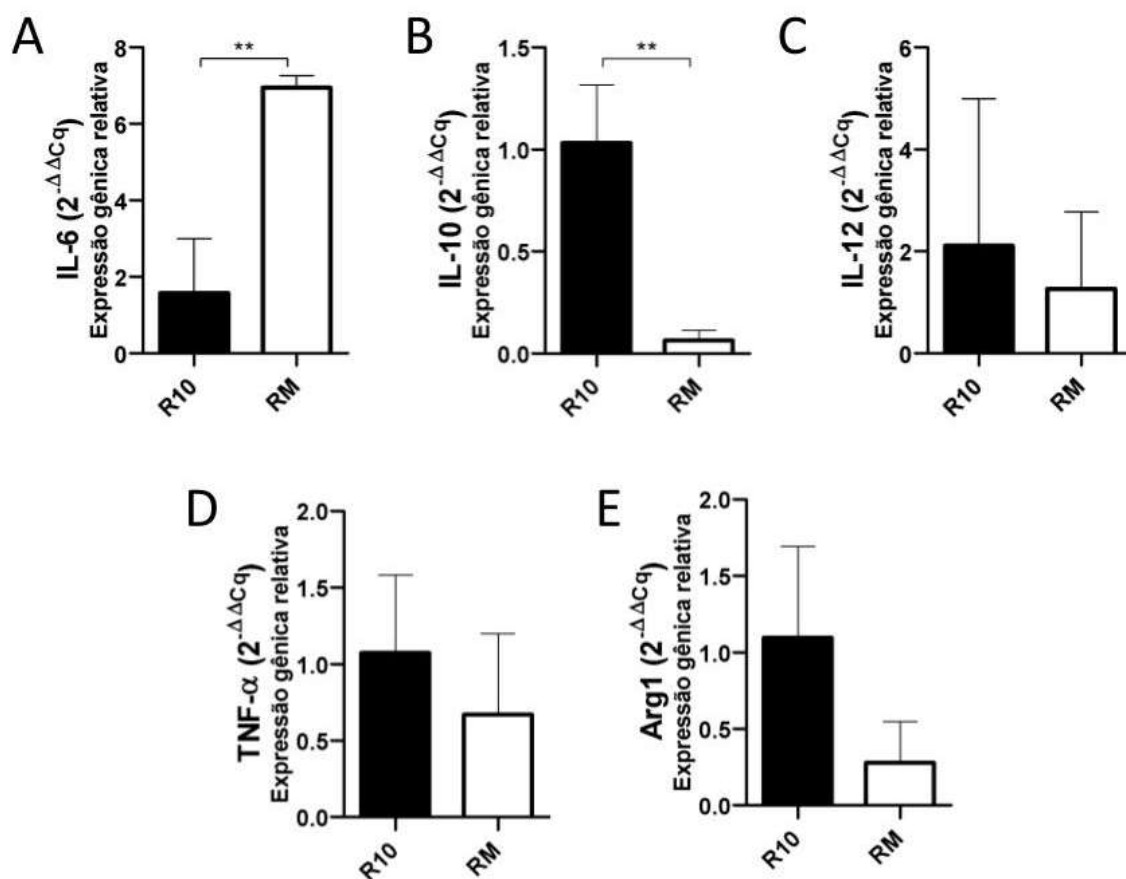


Figura 4: Expressão relativa dos genes que codificam as citocinas IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e da enzima Arginase 1 em macrófagos do grupo Controle (R10), cultivados apenas com R10 e macrófagos do grupo RM, cultivados por 3 dias com meio R10 acrescido de Crotoxina e HG20mM, e por mais 3 dias com meio R10 contendo Nicotinamida e HG30mM. O Teste t de *student* com pós *test* de Mann Whitney não revelou significância estatística.

3.3. Avaliação da produção e consumo de IL-6 pela expressão relativa de genes associados à produção de citocinas nos macrófagos e consumo de IL-6 e Produção de IL-10 por linfócitos B-1

A alta expressão relativa do gene de IL-6 em macrófagos associada aos níveis diminuídos dessa citocina no sobrenadante da cultura sugere o consumo dessa citocina. Deste modo, avaliamos essa premissa investigando genes associados à produção e ao consumo de IL-6 em macrófagos e linfócitos B-1.

A expressão relativa dos genes da MyD88 e NF κ B demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa quando os macrófagos foram submetidos ao protocolo RM (Figura 5). Embora possa ser observado uma tendência ao aumento da expressão de ambos os genes.

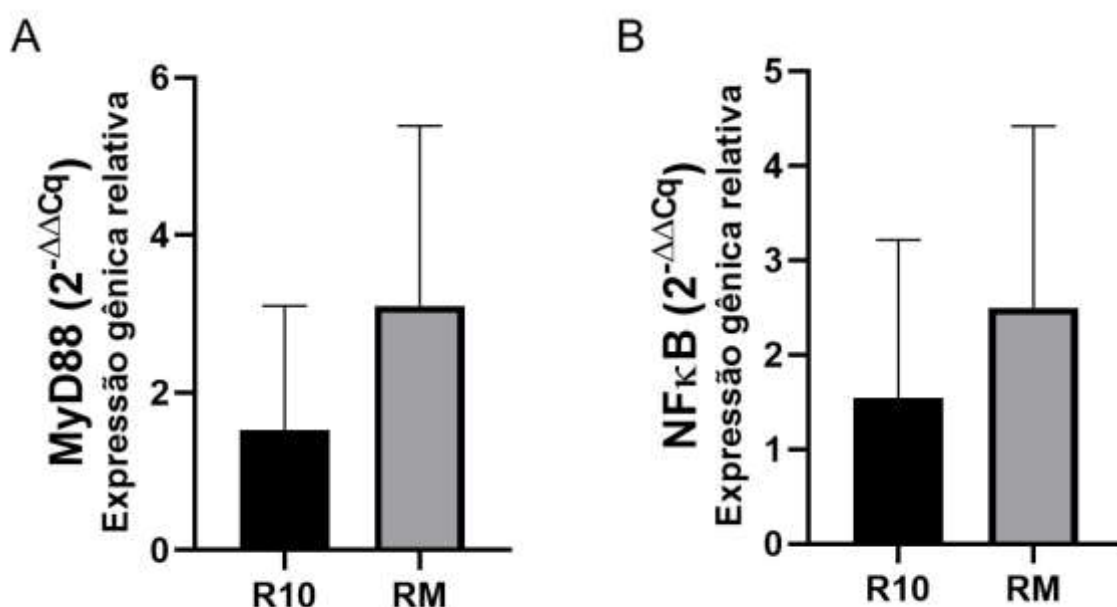


Figura 5: Expressão relativa dos genes de MyD88 e NFκB em amostras de macrófagos do grupo Controle, cultivados apenas com R10 e macrófagos do grupo Insulina, cultivados por 3 dias com meio R10 contendo Crotoxina e HG20mM, e por mais 3 dias com meio R10 contendo Nicotinamida e HG30mM.

Foi avaliada a expressão relativa de três genes nos linfócitos B-1, o receptor de IL-6 (Fig. 6A), o STAT3 (Fig. 6B) e a IL-10 (Fig. 6C). Embora nenhum dos resultados tenham demonstrado significância estatística, é possível observar na figura tendência à regulação positiva da expressão de IL-6R e da IL-10 em linfócitos B-1 do grupo submetido à RM, quando comparado ao controle.

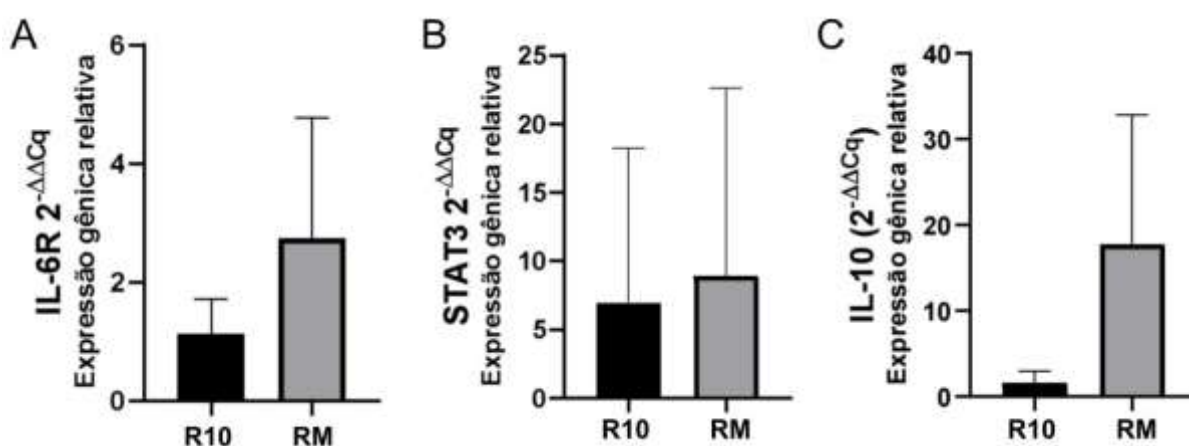


Figura 6: Expressão relativa dos genes de IL-6R, STAT3 e IL-10 em linfócitos B-1 cultivados com R10 (Controle) ou submetidos à RM por meio do cultivo com R10 acrescido de CTX e HG 20mM por 3 dias, substituído por R10 contendo nicotinamida e HG 30mM por mais 3 dias de cultivo (RM).

3.4. Viabilidade dos Macrófagos

O protocolo RM para Linfócito B-1 produtor de Insulina levou ao aumento do percentual de macrófagos vivos (Fig. 7C) e o declínio nas porcentagens de Apoptose e apoptose tardia (D e E respectivamente). Enquanto a porcentagem de Necrose (Fig. 7F) não houve significância estatística, demonstrando que o protocolo melhora a viabilidade das células.

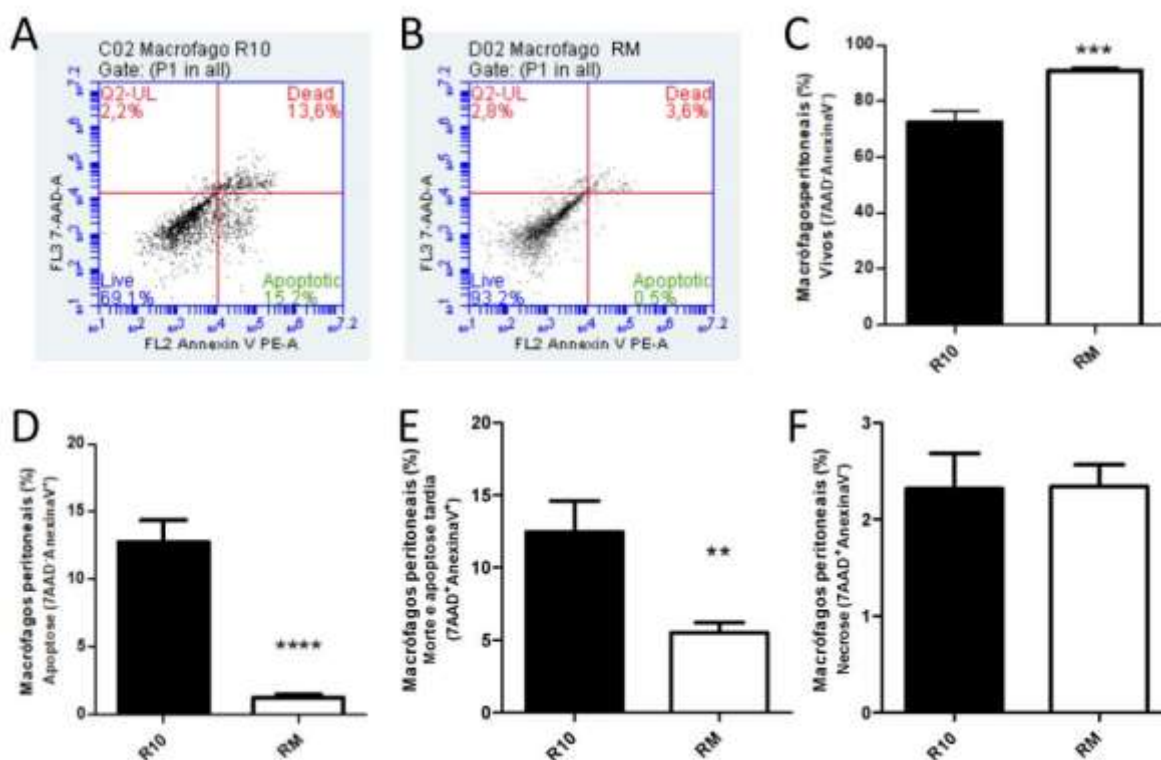


Figura 7: Avaliação da viabilidade celular. Estratégia de gates demonstrando maior percentual de apoptose (quadrante à direita inferior) e apoptose tardia (quadrante à direita superior) em macrófagos A) do grupo controle, cultivado apenas com meio R10 (R10) e B) do grupo submetido à RM para produção de Insulina com meio R10 adicionado de Crotoxina e HG 20mM por 3 dias e meio R10 contendo Nicotinamida e HG 30mM (RM) por mais 3 dias. C) Percentual de Macrófagos Vivos. D) Percentual de Macrófagos em apoptose. E) Percentual de Macrófagos Mortos ou em Apoptose Tardia. F) Percentual de Macrófagos em necrose.

3.5. Uptake de Glicose

A RM para B-1 produtora de Insulina a qual as células foram submetidas levou a diminuição de captação de glicose pelos macrófagos, quando comparados ao grupo controle, como podemos observar na Figura 8C, além da diminuição da expressão relativa do gene da Glut-1, enzima associada a quebra da glicose (Fig.8D).

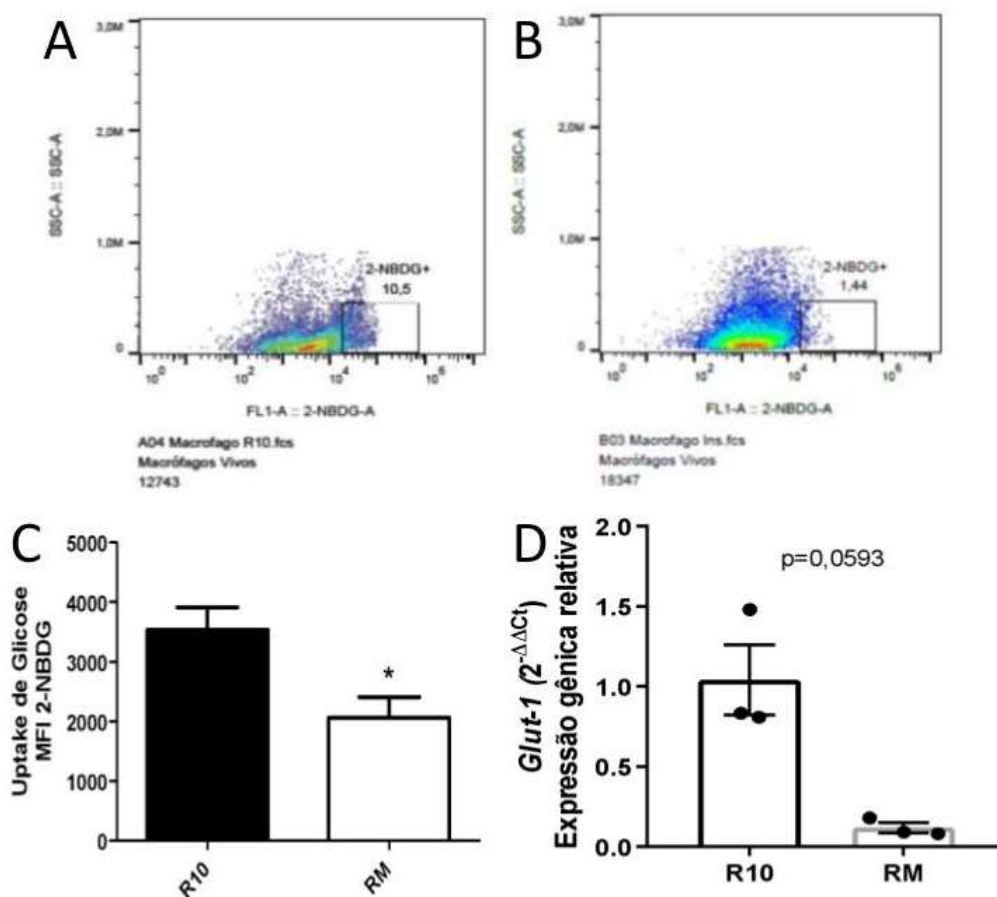


Figura 8: Análise da captação de glicose seguindo o protocolo de adição do 2-NBDG para observação da capacidade de internalização da glicose por macrófagos submetidos ao protocolo RM em R10 contendo Crotoxina e 20mM de glicose, e após 3 dias o meio foi trocado para R10 com Nicotinamida e HG 30mM (R10), e amostras controle cultivadas com meio R10 (R10). A e B) Seleção de macrófagos vivos que captaram a partícula fluorescente 2-NBDG nos grupos Controle e RM, respectivamente. C) Captação de glicose pelos macrófagos. D) Expressão relativa do gene da Glut-1, enzima associada à quebra da glicose. N=4 * $p < 0,05$ determinado pelo teste t de student.

3.6. Avaliação do metabolismo pela expressão relativa dos genes de Glut-1, Hexoquinase, Fosfofrutoquinase, Carnitina Palmitoil Transferase e Atividade Enzimática.

A figura 9 A-D demonstra que em macrófagos submetidos ao protocolo de RM ocorreu regulação negativa da expressão relativa dos genes associados ao metabolismo de glicose (figuras 9A, 9B, 9C e 9D) e à via lipolítica (figuras 9E e 9F) comparado à expressão gênica observada em macrófagos do grupo controle. Enquanto os gráficos presentes na figura 9G-K é possível observar que não houve diferença entre o grupo controle e o grupo submetido à RM, quanto à atividade das

enzimas Carnitina Palmitoil Transferase 1 e Piruvato Quinase (Figuras 9H e 9K), relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos e da glicose, respectivamente. Apesar de não constar significância estatística, houve aumento da atividade de hexoquinase (Figura 9G) e Fosfofrutoquinase (Figura 9I) enquanto para a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi observado diminuição da atividade máxima (Figura 9J).

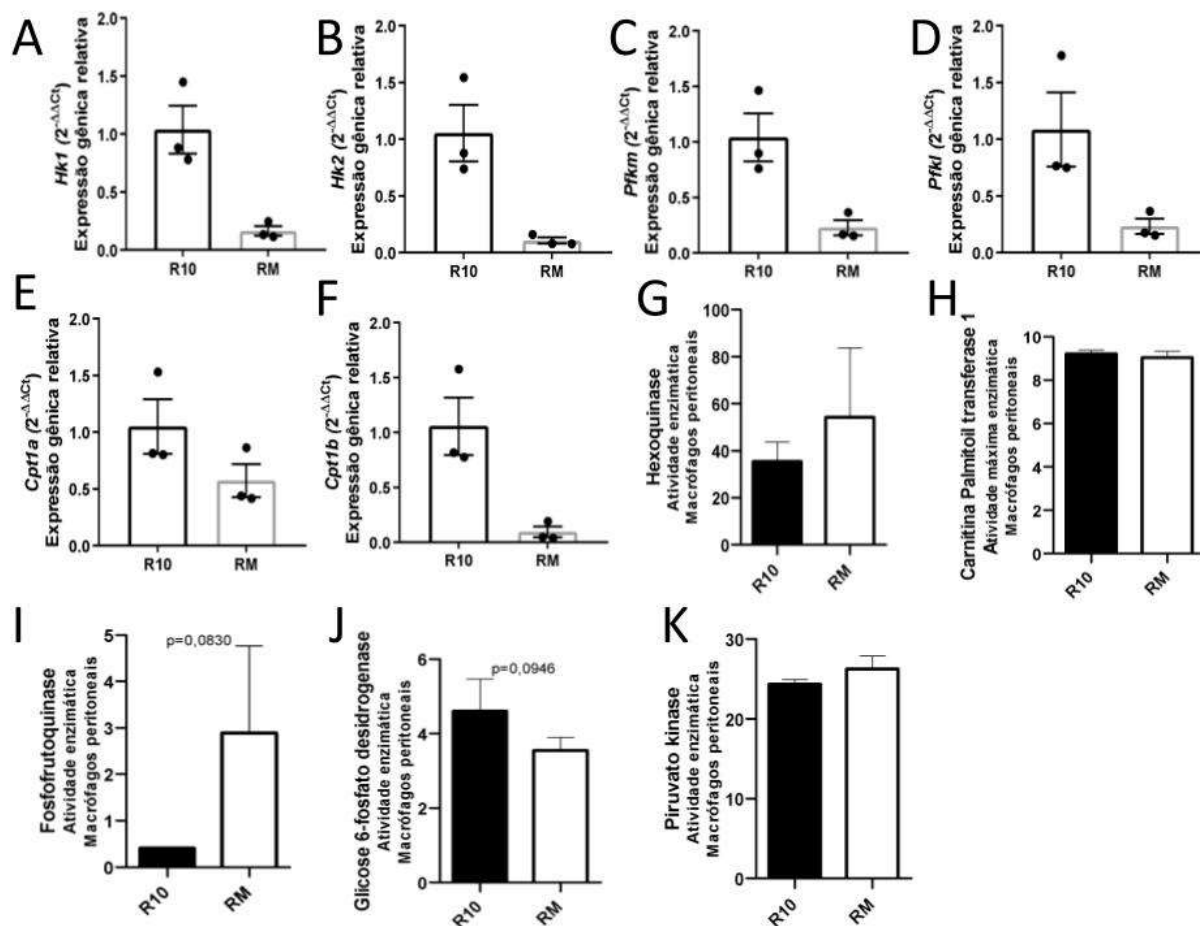


Figura 9: Avaliação do metabolismo pela expressão relativa dos genes associados à quebra da glicose A) Hk1 e B) Hk2 (Hk=Hexoquinase), à via glicolítica clássica C) Pfk m e D) Pfk l (Pfk=Fosfofrutoquinase) e à via lipolítica E) Cpt1a e F) Cpt1b (Cpt1=Carnitina palmitoil transferase I). E avaliação da atividade máxima de enzimas relacionadas ao metabolismo celular. Sendo o grupo R10 o controle e o grupo RM submetido ao protocolo de RM em meio R10 com crotoxina e 20mM de glicose por 3 dias, com troca para o meio R10 com Nicotinamida e 30mM por mais 3 dias. O Teste t de *student* com pós *test* de Mann Whitney não revelou significância estatística.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da RM para células B-1 produtoras de insulina sobre macrófagos peritoneais, células essenciais para a manutenção dos linfócitos B-1 peritoneais *in vitro*. Mesmo que os macrófagos não sejam o alvo dos nossos estudos para produção de insulina, sua presença se faz

necessária para a viabilização de uma terapia celular que pode auxiliar no controle glicêmico de pacientes diabéticos, ou ainda, curá-los.

Como descrito por Thies *et al.* (2013), os macrófagos são capazes de melhorar a sobrevivência dos linfócitos B-1, quando co-cultivados, e que o principal fator do aumento da viabilidade das células B-1 cultivadas com macrófagos, seria a IL-6.²¹ Porém, ao analisarmos a concentração desta citocina nas culturas houve diminuição dos níveis de IL-6 no sobrenadante, já a avaliação da expressão relativa do gene de IL-6 por macrófagos apresentou aumento, assim como a expressão do gene IL-6R pelos linfócitos B-1. Esses dados sugerem que os níveis de IL-6 diminuem no sobrenadante devido ao maior consumo da citocina pelos linfócitos B-1 e também aumento da produção por macrófagos.

Em 2006, Otero *et al.* realizaram um estudo a fim de demonstrar o que causava a resistência à radiação ionizante indutora de apoptose (RiA) em linfócitos B-1 peritoneais. Foi demonstrado que os fatores determinantes eram a presença de IL-6 em conjunto com a IL-10, ainda que em menor quantidade, a presença desta citocina também era necessária.³⁴ Os dados de Otero corroboram com os obtidos neste trabalho, em que é possível observar um aumento da viabilidade dos linfócitos B-1 e das concentrações de IL-10 nas culturas submetidas ao protocolo RM, porém o gene da IL-10 é menos expresso pelos macrófagos, e mais expresso pelos linfócitos. Sugerindo que a manutenção da viabilidade dos linfócitos B-1 é resultado da combinação de IL-6 e IL-10, produzidas em maior quantidade pelos macrófagos e linfócitos B-1, respectivamente. E que a produção em harmonia destas duas citocinas evita a sinalização de apoptose nos linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente para a produção de insulina, melhorando a viabilidade.

Existem dados na literatura que sugerem que a IL-10 secretada pela célula B-1, é responsável pela auto regulação dessa população, porém ambos estudos com células aderentes peritoneais de Thies *et al.* (2013) e de Otero *et al.* (2006) demonstraram que se faz necessária a presença da IL-6 produzida pelos macrófagos, para evitar a sinalização da via de apoptose.^{21 34 35} Indicando que a população de macrófagos peritoneais exerce uma influência na sobrevivência dos linfócitos, assim como o oposto também ocorre. A IL-10 secretada pelos linfócitos B-1 diminui o processo de

fagocitose dos macrófagos e a liberação de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, alterando o perfil dos macrófagos de anti-inflamatório para pró-inflamatório.^{17 36}

As variações entre os dois perfis de macrófagos se devem, inicialmente, a via de ativação recebida pelo monócito, célula precursora dos macrófagos. A via clássica é mediada por Interferon- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), receptores Toll-Like (TLR) e lipossacarídeos, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α), caracterizando os macrófagos M1 e seu perfil inflamatório.^{19 28 37} A segunda via que modula o perfil dos macrófagos para M2 é denominada de via alternativa, e sua ativação é mediada por IL-4 e IL-13, estimulando a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e o processo de fagocitose, a fim de promover a resolução de inflamações.²⁸

Além da presença de IL-10 alterar o perfil dos macrófagos, a Crotoxina (CTX) presente no protocolo RM, também é capaz de realizar esta mudança de polarização. Há evidências na literatura de que a CTX é capaz de alterar a secreção de IL-6 e o metabolismo de macrófagos em ambientes saudáveis ou microambientes tumorais, apresentando resultados diferentes de acordo com os estímulos recebidos, alterando também o fenótipo entre M1 ou M2 e, conseqüentemente, as citocinas liberadas pelas células. Outro ponto de destaque, são as alterações que a CTX causa nas funções e no metabolismo dos macrófagos, há registros de alterações na capacidade fagocítica e no aumento do consumo de glicose e glutamina, por meio da via glicolítica clássica.^{21 36 38} Sendo essa, outro fator de diferenciação entre macrófagos M1 e M2. O M1 utiliza a via clássica de glicólise, produzindo mais ATP e aumentando o consumo de glicose e glutamina, enquanto o M2 realiza a quebra da glicose pela via alternativa, ou via das pentoses e ciclo do ácido tricarboxílico.^{39 40 41}

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com as informações acima, encontradas na literatura. Quando comparados o grupo controle e o grupo RM nas avaliações de atividade enzimática, expressão relativa dos genes das enzimas e das citocinas, e a cinética de citocinas presentes no sobrenadante da cultura, indicando a mudança de perfil dos macrófagos submetidos ao protocolo de M1 para M2.

Para que o organismo esteja em homeostase, é necessário que as populações de M1 e M2 estejam equilibradas. Uma população maior de M2, poderá levar o organismo a imunossupressão, porém, se houver um número superior de M1 ocorre a indução de doenças inflamatórias crônicas.¹⁹ Um exemplo de doença inflamatória crônica que conta com a presença constante de macrófagos, é a obesidade. O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo é normal e esperado, sendo a maioria da população de perfil M2 em indivíduos saudáveis, porém em camundongos obesos a população dominante era de macrófagos M1 agregados estruturalmente em adipócitos em necrose. O mesmo padrão pode ser observado em humanos.^{20 42}

O excesso de inflamação em tecidos metabólicos, como o adiposo, muscular e hepático, leva ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como gordura no fígado, resistência à insulina, comprometimento muscular e DM tipo 2.⁴² Ainda sobre a polarização dos macrófagos, a população M2 secreta IL-10, citocina que intensifica a sinalização de insulina nos adipócitos, mantendo a sensibilidade, porém os macrófagos M1, presentes no tecido adiposo obeso, secreta citocinas pró-inflamatórias que induzem a resistência insulínica. A fagocitose de adipócitos em necrose, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da presença de ácidos graxos saturados, são fatores que estimulam a captação de mais macrófagos M1 e consequentemente aumentando a resistência à insulina.^{20 42}

Neste cenário, as células β -pancreáticas são estimuladas a produzir mais insulina, porém o agravo da obesidade, inflamação e resistência insulínica leva ao esgotamento das funções das células β , resultando em hiperglicemia e consequentemente em um quadro de DM tipo 2.²⁰

Como dito na introdução, os linfócitos B-1 participam de reações autoimunes e durante o processo inflamatório do Pâncreas e das células β -pancreáticas, as células B-1 migram da cavidade peritoneal para o pâncreas, esta migração leva ao agravamento da DM, principalmente do tipo 1.^{7 10 11 12 13 14} Porém, há dados na literatura que indicam os linfócitos B regulam a inflamação do tecido adiposo em quadros de resistência à insulina devido a obesidade, o processo inicia-se pela infiltração no tecido pelos linfócitos B, T e Macrófagos. Essas três populações de células do sistema imune irão ficar agregadas próximas a adipócitos em necrose, os

macrófagos para realizar a fagocitose e os linfócitos B para apresentar antígenos aos linfócitos T e Macrófagos, modulando suas funções.^{43 44} A apresentação dos antígenos leva a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células e também a produção de anticorpos patogênicos por parte dos Linfócitos B, que reduzem a secreção de IgM e aumentam a secreção de IgG.⁴³ Outra função importante dos linfócitos B é a secreção da IL-10, uma citocina protetora de inflamações e a diminuição de sua liberação torna os indivíduos obesos mais suscetíveis à síndrome metabólica e quadros de DM.⁴⁵ Devido a grande importância apresentada pelos linfócitos B nestes quadros de síndrome metabólica desenvolvida após inflamação do tecido adiposo em indivíduos obesos, estas células apresentam um grande potencial como alvos em terapias imunes para o tratamento de resistência à insulina, como descrito no artigo de Winer *et al.* (2012).⁴⁵ Podendo, assim, correlacionar com a proposta do nosso grupo de pesquisa, desenvolver uma terapia celular com linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente para a produção de insulina.

No presente estudo observou-se que o protocolo de Reprogramação Metabólica para Linfócitos B-1 produtores de Insulina melhora a sobrevivência e diminui a taxa de apoptose dos macrófagos, além de diminuir a captação de glicose. O protocolo também altera a atividade de enzimas da via glicolítica dos macrófagos, e em conjunto com os dados analisados da dosagem de citocinas sugere-se que ocorre a alteração do fenótipo destas células para um macrófago com características mais anti-inflamatórias. A RM alterou a expressão de genes, sendo os principais, a regulação positiva da expressão do gene de IL-6 e a regulação negativa da expressão do gene de IL-10, apesar das concentrações destas citocinas estarem inversamente proporcionais. Esta última parte sugere que os linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente estejam consumindo a IL-6, pois o gene dos receptores de IL-6 estão com a expressão regulada positivamente.

E apesar do foco dos estudos serem os linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente para produzirem Insulina, é inegável a dependência das culturas de células B-1 com a presença de macrófagos, principalmente após a aplicação do protocolo. Essas duas populações, quando estimuladas, trabalham em simbiose para a sobrevivência dos linfócitos, dificultando o monocultivo de B-1. Os resultados deste projeto elucidam o papel dos macrófagos no co-cultivo com os linfócitos B-1,

principalmente após o protocolo. E nos faz questionar meios de realizar um monocultivo eficaz de células B-1 peritoneais.

Os resultados deste estudo sugerem a sinergia de produção da IL-10 e IL-6 por Linfócitos e Macrófagos, respectivamente. Evidenciando a dependência das células B-1 ao co-cultivo com os macrófagos, e promovendo fundamentos para que novos estudos sejam realizados a fim de melhorar as condições de monocultivos das células B-1 e avançar no desenvolvimento da terapia celular para pacientes diabéticos.

5. REFERÊNCIAS

1. Charley, E.; Dinner, B.; Pham, K.; Vyas, N. Diabetes as a consequence of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* (2023) 21;29(31):4736-4743. doi: 10.3748/wjg.v29.i31.4736. PMID: 37664150. PMCID: PMC10473919
2. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2021. Results. Institute for Health Metrics and Evaluation. 2024 (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>).
3. Deshpande, A. D.; Harris-Hayes, M.; Schootman, M. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related complications, *Physical Therapy*, Vol. 88, Issue 11 (2008)
4. Memon, B.; Abdelalim, E.M. Stem Cell Therapy for Diabetes: Beta Cells versus Pancreatic Progenitors. *Cells.* (2020) 23;9(2):283. doi: 10.3390/cells9020283. PMID: 31979403. PMCID: PMC7072676.
5. Altabas, V.; Bulum, T. Current Challenges in Pancreas and Islet Transplantation: A Scoping Review. *Biomedicines.* (2024) 15;12(12):2853. doi: 10.3390/biomedicines12122853. PMID:39767759. PMCID: PMC11673013.
6. El-Badawy, A.; El-Badri, N. Clinical Efficacy of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Plos One* (2016) 13;11(4):e0151938. doi: 10.1371/journal.pone.0151938. PMID: 27073927. PMCID: PMC4830527.
7. Alvares-Saraiva, A.M.; Novo, M.C.; de Oliveira, V.C.; Maricato, J.T. *et al.* B-1 cells produce insulin and abrogate experimental streptozotocin induced Diabetes. *Eur J Immunol* (2015). 45(5):1452-61. doi: 10.1002/eji.201445409. PMID: 25688546
8. Bhat, N.M.; Kantor, A.B.; Bieber, M.M.; Stall, A.M.; Herzenberg, L.A.; Teng, N.N. The Ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+B). *Cells. Int. Immunol.* (1992) 4(2):243-52. doi:10.1093/intimm/4.2.243. PMID: 1377947

9. Ghosn, E.E.; Sdate-Ngatchou, P.; Yang, Y.; Herzenberg, L.A. Distinct progenitors for B-1 and B-1 cells are present in adult mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011) 15;108(7):2879-84. doi:10.1073/pnas.1019764108. PMID: 21282663. PMCID: PMC3041118.
10. Baumgarth, N.; Herman, O. C.; Jager, G.C.; Brown, L.E.; Herzenberg, L.A.; Chen, J. B-1 and B-1 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* (2000). 17;192(2):271-80. doi: 10.1084/jem.192;2;271. PMID: 10899913. PMCID: PMC2193249.
11. Kantor, A.B.; Herzenberg, L.A. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* (1993). 11:501-38. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.002441. PMID: 8476571.
12. Corte-Real, J.; Duarte, N.; Tavares, L.; Penha-Gonçalves, C. Innate stimulation of B-1 cells enhances the autoreactive IgM repertoire in the NOD mouse: implications for type 1 diabetes. *Diabetologia* (2012) 55(6):1761-72. doi:10.1007/s00125-012-2498-0. PMID: 22382518.
13. Kendall, P.L.; Woodward, E.J.; Hulbert, C.; Thomas, J. W. Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* (2004) 34(9):2387-95. doi: 10.1002/eji.200324744. PMID: 15307171.
14. Duan, B.; Morel, L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* (2006) 5(6):403-8. doi:10.1016/j.autrev.2005.10.007. PMID: 16890894.
15. Almeida, S.R.; Aroeira, L.S.; Frymuller, E.; Dias, M.A.; Bogsan, C.S.; Lopes, J.D.; Mariano, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int. Immunol.* (2001) 13(9):1193-201. doi:10.1093/intimm/13.9.1193. PMID: 11526100.

16. Wang, Y.; Rothstein, T.L. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. *Front. Immunol.* (2012) 11;3:281. doi: 10.3389/fimmu.2012.00281. PMID: 22973276. PMCID: PMC3438481.
17. Popi, A.F.; Lopes, J.D.; Mariano, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages *in vitro*. *Immunology* (2004) 113(3):348-54. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01969.x. PMID: 15500621. PMCID: PMC1782584.
18. Neves, E. M. S. F. T. (2015) MACRÓFAGOS: Biologia, Diversidade e Função. [Dissertação/Tese de mestrado]. [Porto(PT)]: Universidade Fernando Pessoa.
19. Cassado, A. A. (2011) Peritoneal macrophage heterogeneity.158f. [Ph. D. Thesis (Immunology)]. [São Paulo (SP)]: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
20. Bai, J.; Liu, F. The Yin-Yang functions of macrophages in metabolic disorders. *Life Medicine* (2022) 1 (3):319-32 doi: 10.1093/lifemedi/lnac035.
21. Thies, F.G.; Laurindo, M.F.L.; Perez, E.C.; Novaes e Brito, R.R.; Mariano, M. *et al.* Cross talk between peritoneal macrophages and B-1 cells *in vitro*. *Plos One* (2013) 8(5):e62805. doi: 10.1371/journal.pone.0062805. PMID: 23667522. PMCID: PMC3648527.
22. Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response, *Biochemical Journal* (1990) 265. 621-636.
23. Naka, T.; Nishimoto, N.; Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res Ther* 4 (2002) S233
24. Rose-John, S. Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling, *Cytokine* (2021) 144.
25. Wolvekamp, M. C. J.; Marquet, R. T. Interleukin-6: Historical background, genetics and biological significance. *Immunology Letters* (1990) 24.1-9.

26. Franco, D. G. Fator de transcrição nuclear Kappa B no sistema nervoso central: do Fisiológico ao Patológico. *Revista da Biologia* (2018) 4. 1.35-39.
27. Castoldi, A. MyD88: um modulador do perfil inflamatório e metabólico na obesidade experimental [Tese (Doutorado em Imunologia)]. (2015) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
28. Zheng, Y.; Li, Y.; Ran, X.; Wang, D.; Zheng, X.; Zheng, M.; Yu, B.; Sun, Y.; Wu, J. Mettl14 mediates the inflammatory response of macrophages in atherosclerosis through the NF- κ B/IL-6 signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2022) 79:311.
29. Xiao, W. Advances in NF-KappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Ummunol.* (2004)1(6): 425-35.
30. Glezer, I.; Marcourakis, T.; Avellar, M. C. W.; Gorenstein C.; Scavone, C. The role of the transcription factor NF- κ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs, *Rev Bras Psiquiatr* (2000) 22.1. 26-30.
31. Kramer, I. M. Activation of the Innate Immune System: The Toll-Like Receptor-4 and Signaling through Ubiquitylation. *Signal Transduction* (2016) 3. 741-775.
32. Mihara, M.; Hashizume, M.; Yoshida, H.; Suzuki, M.; Shiina, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* (2012) 122(4): 143-59. doi: 10.1042/CS20110340. PMID: 22029668.
33. Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H.M.; Müller-Newen, G.; Schaper, F. Principles of Interleukin (IL) - 6 type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* (2003) 15;374 (PT1): 1-20. doi: 10.1042/BJ20030407. PMID: 12773095. PMCID: PMC1223585.
34. Otero, D.C.; Poli, V.; David, M.; Rickert, R.C. Cutting edge: inherent and acquired resistance to radiation-induced apoptosis in B cells: a pivotal role for STAT3. *J Immunol*

(2006) 15;177(10): 6593-7. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.6593. PMID: 17082570. PMCID: PMC2770730.

35. O'Garra, A.; Chang, R.; Go, N.; Hastings, R.; Haughton, G.; Howard, M.; Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* (1992) 22(3):711-7. doi: 10.1002/eji.1830220314. PMID: 1547817

36. Neves, C.L.; Barbosa, C.M.V; Ranéia-Silva, P.A.; Faquim-Mauro, E.L.; Sampaio, S.C. Crotoxin Modulates Macrophage Phenotypic Reprogramming. *Toxins (Basel)*. (2023) 17;15(10):616. doi: 10.3390/toxins15100616. PMID: 37888647. PMCID: PMC10611389.

37. Viração, T. A. (2022) Influência das vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma no metabolismo de macrófagos murinos – *Estudo in vitro*. [Tese de Doutorado]. [São Paulo (SP)]: Universidade Paulista.

38. Faiad, O. J. Efeito da crotoxina sobre função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. (2012) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

39. Curi, R.; Siqueira Mendes, R. S.; de Campos Crispin, L. A. C.; Norata G. D.; Sampaio, S. C.; Newsholme P. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. *Clin. Sci. (Lond)*. (2017) 15;131(12):1329-1342.

40. Yunna C.; Mengru H.; Lei W.; Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* (2020) 15;877:173090.

41. O'Neil, L.; Kishton, R.; Rathmell, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16, 553-565.

42. Chawla, A.; Nguyen, K.; Goh, Y. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* (2011) 11(11):738-49. doi: 10.1038/nri3071. PMID: 21984069. PMCID: PMC3383854.

43. Winer, D.; Winer, S.; Shen, L.; *et al.* B lymphocytes as emerging mediators of insulin resistance. *Int. J. Obes. Supp.* (2012) (Suppl1):S4-S7. doi:10.1038/ijosup.2012.2. PMID: 25089193 PMCID: PMC4109086.
45. Mauri, C.; Ehrenstein, M.R. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* (2008) 29(1):34-40. doi: 10.1016/j.it.2007.10.004. PMID: 18289504.
45. Winer, D.A.; Winer, S.; Chng, M.H.; Shen, L.; Engleman, E.G. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* (2014) 71(6):1033-43. doi: 10.1007/s00018-013-1486-y. PMID: 24127133. PMCID: PMC3954849.

MATERIAL SUPLEMENTAR

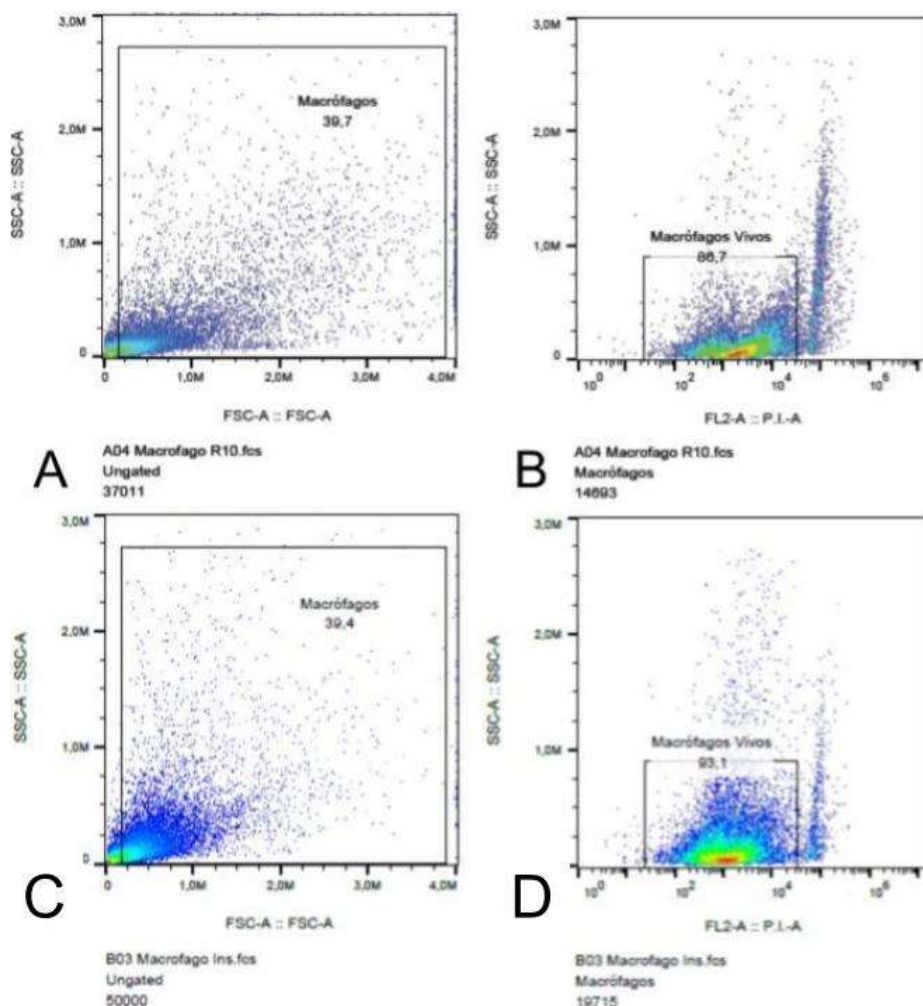


Figura da estratégia de gates para análise do Uptake de Glicose no grupo (A e B) controle, cultivado com R10 (R10) e no grupo (C e D) submetido à RM com meio R10 contendo Crotoxina e HG 20mM por 3 dias, depois substituído por meio R10 com Nicotinamida e HG 30mM (INS) por mais 3 dias. A e C) Seleção da população de macrófagos considerando tamanho FSC e complexidade SSC; B e D) Exclusão de células mortas pelas marcação com iodeto de propídio.