



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Felipe Corrêa da Silva

Papel do neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH na micróglia: implicações  
imunometabólicas

**CAMPINAS**

**2019**

**Felipe Corrêa da Silva**

**Papel do neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH na micróglia: implicações  
imunometabólicas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Imunologia.*

*Orientador: Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELO ALUNO FELIPE CORRÊA  
DA SILVA E ORIENTADA PELO ORIENTADOR  
PEDRO MANOEL MENDES DE MORAES  
VIEIRA

**CAMPINAS**

**2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C817p Corrêa-da-Silva, Felipe, 1994-  
Papel do neuropéptido  $\alpha$ -MSH na micróglia : implicações imunometabólicas / Felipe Corrêa da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Micróglia. 2. Obesidade. 3. Pró-opiomelanocortina. 4. Hipotálamo. I. Vieira, Pedro Manoel Mendes de Moraes, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Role of  $\alpha$ -MSH on microglial cells : immunometabolic implications

**Palavras-chave em inglês:**

Microglia

Obesity

Pro-opiomelanocortin

Hypothalamus

**Área de concentração:** Imunologia

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira [Orientador]

Niels Olsen Saraiva Câmara

Lício Augusto Velloso

**Data de defesa:** 17-12-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7333-367X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0118800965572639>

Campinas, 17 de dezembro de 2019

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

**à todos os animais que  
deram sua vida para que este  
trabalho fosse realizado.**

## Agradecimentos

Foram quase três anos de formação e dedicação junto ao Laboratório de Imunometabolismo. Durante o período em que estive inserido no laboratório entrei em contato com diversas pessoas que me ensinaram e me permitiram moldar meus pensamentos, sejam eles no âmbito científico ou pessoal. Durante toda esta etapa pude aprender inúmeras coisas, e, talvez até mais importante que isso, ressignificar tantas outras.

Por muito tempo pensei se deveria fazer um agradecimento à Deus. Colocar o divino e ciência em um mesmo tópico é sempre delicado, e até mesmo perigoso no atual contexto político-social em que vivemos. Agradeço à Deus, pelas oportunidades e força, fundamentalmente essenciais para que pudesse concluir essa etapa. Tomo a liberdade de inserir um texto, em tradução livre, do filósofo Freidrich Niezsche – Oração ao Deus Desconhecido.

“Antes de prosseguir no meu caminho  
E lançar o meu olhar para frente  
Uma vez mais elevo, só, minhas mãos a Ti,  
Na direção de quem eu fujo.  
A Ti, das profundezas do meu coração,  
Tenho dedicado altares festivos,  
Para que em cada momento  
Tua voz me possa chamar.  
Sobre esses altares está gravada em fogo  
Esta palavra: “ao Deus desconhecido”  
Eu sou teu, embora até o presente

Me tenha associado aos sacrílegos.

Eu sou teu, não obstante os laços

Me puxarem para o abismo.

Mesmo querendo fugir

Sinto-me forçado a servi-Te.

Eu quero Te conhecer, ó Desconhecido!

Tu que me penetras a alma

E qual turbilhão invades minha vida.

Tu, o Incompreensível, meu Semelhante.

Quero Te conhecer e a Ti servir.”

À minha família, que me apoiou e incentivou a realização deste trabalho, mesmo que algumas vezes de maneira inconsciente. Meus pais, Adriana e Anderson; que colocaram grande esforço e incentivo em todas as etapas de formação que passei até agora. Meus irmãos, Caio e Thiago, que me apoiaram nesta caminhada. Minha avó paterna Leonilde, que sempre me apoiou e deu suporte para minha formação. Meus tios, Alexandre e Rosângela, que mesmo nem sempre em contato direto, também deram apoio. Aos demais familiares, que torceram, apoiaram e deram suporte de qualquer maneira. Obrigado pela atenção, incentivo e suporte.

Por medo de esquecer de alguém, deixo um agradecimento genérico aos amigos, quer seja pelo apoio, incentivos, discussões ou momentos de distrações.

À equipe do Laboratório de Imunometabolismo. Agradeço ao professor Pedro Vieira pela orientação, apoio, suporte e incentivo acadêmico; além de todas as

ferramentas para o desenvolvimento do projeto. Aos integrantes do Laboratório de Imunometabolismo, com quem dividi cafés, broncas, memes e histórias. Sou grato pelos ensinamentos, discussões e apoio em experimentos essenciais para a execução deste trabalho. Além de possibilitarem a realização dos experimentos, a troca de ideias e discussões foram essenciais para a evolução do trabalho. Agradeço também aos colegas de laboratório a possibilidade de discutir seus projetos, o que me permitiu crescer como cientista. Obrigado, Lauer, Cris, Leonardo, Gustavo, Jéssica Pereira, Gisele, Ana, Mirella, Guilherme, Douglas, João, Juliana, Janaína, Jéssica Andrade; o apoio de vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. À Andrea, quem apesar de não ser aluna do professor Pedro, compartilhamos espaços e discussões, e que foi uma grande incentivadora deste projeto também. À Flávia, que sempre esteve no laboratório ao lado.

À professora Mariana Nery, que sempre me apoiou e ouviu; e que também permitiu o uso da infraestrutura de seu laboratório.

À minha banca de qualificação, professora Denise Fonseca, professor Marcelo Mori e doutora Maria Fernanda Forni, que trouxeram contribuições extremamente pertinentes.

Aos professores Marcelo Menossi e Marcelo Mori, por permitir o uso da infraestrutura de seus laboratórios.

Aos funcionários Célia Bresil, Marcos e Herbet, os quais auxiliaram, em diversos níveis, a execução dos experimentos realizados.

À Chun-Xia Yi, que me recebeu em seu laboratório na Universidade de Amsterdam, com observações e auxílio para que este projeto fossem

desenvolvidos. Aos integrantes de seu laboratório – Martin, Irina, Eline, Mila, Nikita, Fernando, Shan Shan, pelo auxílio e paciência. Às demais pessoas, que, direta ou indiretamente, permitiram e incentivaram a execução deste trabalho durante o estágio em Amsterdã – Rawien, Ling, Zala, Paul, Elaine, Stijn, Laura, Julien, Dikisha e Kelly.

À equipe do Laboratório de Sinalização Celular, onde estive grande parte da minha graduação e o professor Lício Velloso, pelos ensinamentos, apoio técnico e suporte.

Às equipes dos demais laboratórios da Imunologia, que auxiliaram na discussão dos dados e incentivo.

À banca examinadora, pela disponibilidade, discussão e enriquecimento.

À FAPESP (2015/15626-8; 2017/0622-5; 2018/12257-0) e FAEPEX pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

### **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunometabolismo, no Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico – CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (0001) e Fundo de Apoio Pesquisa e Extensão – FAEPEX.

## RESUMO

Silva, F.C.. Papel do neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH na micróglia: implicações imunometabólicas.. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2019

A compreensão dos mecanismos da gênese da obesidade, bem como a capacidade de reversão do fenótipo obeso, é de extrema importância para a prevenção e combate desta patologia e suas comorbidades. O hipotálamo, localizado no sistema nervoso central, coordena a homeostase energética, através da atuação de duas populações neuronais com funções antagônicas. O consumo de dietas ricas em gorduras saturadas promove inflamação hipotalâmica e prejudica a sinalização anorexigênica, que possui como efetores funcionais os clivados do peptídeo POMC. Sabe-se que a disfunção dos neurônios anorexigênicos (neurônios que expressam POMC) ocorre devido a instalação do processo inflamatório e em dois níveis distintos: numérico (morte celular) e funcional. Os peptídeos clivados de POMC, além de seu papel na homeostase energética, apresentam conhecidos papéis anti-inflamatórios. Nenhum trabalho até então explorou o impacto da disfunção de tais peptídeos na inflamação hipotalâmica. Hipotetizamos que a disfunção de neurônios POMC é um dos eventos necessários para a perpetuação e intensificação do sinal inflamatório no hipotálamo, uma vez que ocorre diminuição dos níveis teciduais de  $\alpha$ -MSH, um dos peptídeos clivados a partir de POMC, em condições obesogênicas. Avaliamos o papel de  $\alpha$ -MSH na função efetora de micróglia primária. Nossos dados demonstraram que o  $\alpha$ -MSH reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias pela micróglia induzida pela ativação com LPS devido à atuação do neuropeptídeo no receptor de melanocortina 3 (MC3R). O tratamento com  $\alpha$ -MSH também aumenta a atividade fagocítica de micróglia. Tais efeitos imunorreguladores são dependentes de alterações no metabolismo celular, havendo significativa redução da glicólise em células tratadas com  $\alpha$ -MSH. Porém, não houve participação do metabolismo mitocondrial (oxidação fosforilativa e produção de ATP mitocondrial) nos efeitos imunorreguladores do  $\alpha$ -MSH. Além disso, animais agudamente tratados com  $\alpha$ -MSH, através de injeção estereotáxica, apresentaram redução da inflamação

hipotalâmica, corroborando o fenótipo encontrado em cultura celular. Desta maneira, é possível afirmar que o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH é modulador da micróglia, levando a alterações em sua função efetora em um mecanismo dependente de alterações imunometabólicas.

Palavras chave: hipotálamo, obesidade, micróglia, imunometabolismo.

## ABSTRACT

Silva, F.C. Role of the neuropeptide  $\alpha$ -MSH in microglia; immunometabolic implications. Dissertation (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2019

The molecular mechanisms involved in the genesis of obesity are extremely relevant for prevention and future treatment of metabolic diseases. The systemic metabolic regulation, in mammals, is orchestrated by neurons located in the hypothalamus. These neurons are able to sense and integrate peripheral signals, which inform the organism its nutritional status. The impairment of anorexigenic signals is a multifactorial event and, in diet-induced obesity, is mainly induced by the consumption of saturated fatty acids. Effectively, this impairment is translated into death and malfunctioning of POMC (Pro-opiomelanocortin) expressing neurons, triggered by neuroinflammation. Microglia are resident macrophages in the central nervous system and are directly involved in neuroinflammation. Thereby, microglia activation is an essential hub in the genesis of obesity. Our data show that alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), a POMC-derived peptide, has immunoregulatory roles.  $\alpha$ -MSH treatment diminished the expression of proinflammatory cytokines in primary murine microglia cells, in a mechanism dependent of melanocortin receptor 3 – MC3R. Also,  $\alpha$ -MSH treatment induced the phagocytic activity of microglia, a determinant feature of microglia effector function. We found that the immunoregulatory roles of  $\alpha$ -MSH in microglia are dependent of immunometabolic regulations, centered in damping of glycolytic profile of microglia, which is a hallmark of proinflammatory macrophages. MC3R expression is induced by proinflammatory stimuli and is also dependent on glycolytic induction. We found that the mitochondrial metabolism is unaltered by  $\alpha$ -MSH treatment, regardless of LPS activation. Furthermore, acute  $\alpha$ -MSH administration into the hypothalamus of mice on high fat diet led to reduction of the proinflammatory mediators, as observed *in vitro*. Thereby  $\alpha$ -MSH has anti-inflammatory properties, translated into damping of the expression of cytokines in an immunometabolic dependent pathway.

## Lista de Ilustrações

Figura 1: Esquema da reprogramação metabólica característica de macrófagos polarizados com o perfil M1 ou M2

Figura 2:  $\alpha$ -MSH exerce efeitos imunoreguladores através do MC3R

Figura 3:  $\alpha$ -MSH limita glicólise induzida por LPS

Figura 4:  $\alpha$ -MSH apresenta efeitos imunorreguladores independente da função mitocondrial

Figura 5:  $\alpha$ -MSH não promove alterações no conteúdo e ultraestrutura mitocondrias da micróglia

Figura 6: O neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH promove alterações no estado redox da micróglia

Figura 7:  $\alpha$ -MSH reduz a inflamação hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica

Figura 8: A micróglia humana é responsiva ao  $\alpha$ -MSH

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Tabela 2: Sequência dos genes-alvo avaliados

## Lista de Abreviaturas e Siglas

2-DG: 2-deoxy glicose

2-NBDG: 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose

AgRP: Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti

Arc: Núcleo Arqueado

CART: Transcrito Responsivo à Cocaína e à Anfetamina

COXIV: Citocromo oxidase c

DIO: Obesidade Induzida por Dieta

ECAR: Taxa de Acidificação Extracelular

FAD: nucleotídeo de flavina

FBS: soro fetal bovino

FCCP: fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HIF-1 $\alpha$ : Fator Induzido por Hipóxia 1  $\alpha$

HFD: Dieta hiperlipídica

IL-13: Interleucina 13

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

LPS: lipopolissacarídeo

MC1R: Receptor de Melanocortina 1

MC3R: Receptor de Melanocortina 3

MC4R: Receptor de Melanocortina 4

MC5R: Receptor de Melanocortina 5

mROS: Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO: Óxido Nítrico

NOX2: NADH Oxidase 2

NPY: Neuropeptídeo Y

OCR: Taxa de Consumo de Oxigênio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PFKFB3: 6-fosfofructo-2-kinase / frutose-2,6-bifosfatase 3

PKM2: Piruvato Kinase 2

POMC: Pro-opiomelanocortina

PVN: Núcleo Paraventricular

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico

TH: Tirosina Hidroxilase

Th1: T auxiliadora 1

Th2: T auxiliadora 2

TLR2: Toll like receptor 2

TLR4: Toll like receptor 4

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

Wild type: selvagem

$\alpha$ -MSH: Hormônio Estimulante de Melanócitos Alfa

# Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>19</b>
1.1 Obesidade e Hipotálamo	19
1.2 Micróglia	22
1.3 Imunometabolismo	24
<b>2. Justificativa</b>	<b>29</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>30</b>
4.1 Animais	30
4.2 Cultivo Celular	30
4.3 Citometria de Fluxo	33
4.4 Dosagem Extracelular de Citocinas	34
4.5 PCR em tempo real	34
4.6 Imunofluorescência	35
4.7 Ensaio de Atividade Metabólica	36
4.8 Imunofluorescência	37
4.9 Fluorescent Lifetime Microscopy	37
4.10 Captação de Glicose	37
4.11 Injeção Estereotáxica	38
4.12 Análises Estatísticas	39
<b>5. Resultados</b>	<b>40</b>
5.1 $\alpha$ -MSH exerce efeitos imunoreguladores através do MC3R	40
5.2 $\alpha$ -MSH limita a glicólise induzida por LPS	43
5.3 O tratamento com $\alpha$ -MSH não leva a alterações no metabolismo mitocondrial	47
5.4 $\alpha$ -MSH reduz inflamação hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica	52
5.5 A micróglia humana é responsiva ao $\alpha$ -MSH	54
<b>6. Discussão</b>	<b>55</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>60</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>61</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>69</b>
9.2 Declaração Bioética – Foirmulário CEUA	69
9.2 Declaração referente a direitos autorais	71

## **1.Introdução**

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal, com extensos prejuízos para a saúde do indivíduo. É uma doença multifatorial, que envolve fatores genéticos, endócrinos e ambientais, com componentes como aporte/qualidade nutricional e sedentarismo [1, 2]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o estabelecimento da obesidade é acompanhado por um aumento de risco de outros distúrbios, denominados comorbidades; entre eles estão doenças coronarianas, diabetes *mellitus* e alguns tipos de câncer[1, 2].A OMS também estima que em 2015 o número de adultos obesos ou com sobrepeso chegou a 3 bilhões, atingindo principalmente as sociedades ocidentais [2]. No Brasil, um estudo conduzido pelo Ministério da Saúde aponta que 48% da população adulta está com sobrepeso (33,1%) ou obesa (15%) [1, 2]. Estudos independentes mostram que ambos os gêneros apresentam essa proporção aproximada de indivíduos com sobrepesos ou obesos, o que indica que a epidemiologia da obesidade no Brasil não é dependente de gênero [1, 2] . O grupo etário de maior destaque neste quesito são as crianças e os adolescentes, sendo que aproximadamente um terço dos indivíduos desta faixa etária é afetada pela obesidade e sobrepeso [3].

### **1.1 Obesidade e Hipotálamo**

A ingestão alimentar é relacionada à obesidade devido ao volume de consumo alimentar, bem como a composição e qualidade da dieta. O hipotálamo, localizado no sistema nervoso central (SNC) é o principal centro regulador da homeostase energética, promovendo o balanço entre ingestão calórica e gasto

energético. Nesta região existem populações neuronais distintas que integram e coordenam sinais periféricos, informando a respeito do estado nutricional do indivíduo. As populações que recebem primariamente estes sinais estão presentes no núcleo Arqueado (Arc) e são responsivos a insulina e leptina [4-12]. Estes dois hormônios atuam em conjunto nos neurônios do Arc, uma vez que existe comunicação cruzada entre suas vias de sinalização [13]. A população mediadora de efeitos anorexigênicos é caracterizada pela co-expressão de pro-opiomelanocortina (POMC) e o Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetaminas (CART) [5-8].

A população anorexigênica é então ativada durante o período pós-prandial, em que existe aumento dos níveis plasmáticos de leptina e insulina. A sinalização destes hormônios promove uma cascata de sinalização neuronal, que levará à transcrição dos neuropeptídeos anorexigênicos [5-8]. A partir da ação de convertases, com destaque para a PC1/3 no hipotálamo médio-basal, o POMC é clivado em polipeptídeos funcionais [11]. O hormônio estimulante de melanócitos alfa ( $\alpha$ -MSH) é o principal efetor funcional anorexigênico, sendo composto por treze resíduos de aminoácidos e amplamente conservado evolutivamente [11]. Após sua maturação, o  $\alpha$ -MSH é liberado dos terminais axonais neuronais e perpetua o sinal anorexigênico, se ligando em neurônios de segunda ordem, presentes principalmente no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo [11-13]. As conexões do PVH com o núcleo parabraquial são responsáveis pela supressão do apetite; e também a partir do núcleo parabraquial existem sinapses com o núcleo do trato solitário que serão responsáveis pelas repercussões periféricas da sinalização hipotalâmica, como a diminuição da glicemia [11, 14-24]. O  $\alpha$ -MSH é o principal ligante de

receptores específicos de melanocortinas no hipotálamo, especialmente o receptor de melanocortina 4 (MC4R), expresso em tais populações neuronais de segunda ordem responsáveis pela perpetuação do sinal anorexigênico [11-13]. Desta forma, a este sistema denominamos sistema de melanocortina central.

As populações orexigênicas presentes no Arc possuem maior atividade durante o jejum, quando os níveis plasmáticos de leptina e insulina são reduzidos, e sua ativação resulta em aumento de fome e diminuição do gasto energético [8]. Essas populações são caracterizadas pela expressão de Neuropeptídeo Y (NPY)/Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP). Os dois neuropeptídeos orexigênicos apresentam função redundante [12]. Acredita-se que a ação de NPY esteja relacionada com a necessidade mais imediata de consumo alimentar, enquanto que as repercussões da sinalização de AgRP tenham efeitos a longo prazo [12]. A promoção do apetite pelos neurônios AgRP é resultado da inibição da atividade de neurônios POMC (através de sinapses gabaérgicas inibitórias) e inibição da atividade das melanocortinas no PVN, uma vez que o AgRP é um agonista inverso do MC4R [25-32]. A conexão direta de neurônios AgRP com neurônios do núcleo parabraquial, recentemente demonstrada, é um mecanismo pouco conhecido da promoção do apetite independente do sistema de melanocortinas [33]. No modelo murino, a obesidade induzida por dieta leva à resistência hipotalâmica aos sinais induzidos via insulina e leptina. Milanski e colaboradores [34] demonstraram que a gordura saturada é o principal indutor deste quadro inflamatório. A persistência do processo inflamatório leva à morte neuronal a longo prazo, especialmente de neurônios POMC [35]. A regulação anômala de POMC

precede a presença de marcadores inflamatórios em um modelo de predisposição e propensão a obesidade em camundongos heterogênicos [36]. A inflamação crônica de baixo grau é comum nas patologias relacionadas à obesidade, atingindo não só o hipotálamo, mas outros tecidos relevantes na homeostase energética, como por exemplo o tecido adiposo visceral [37]. Os prejuízos acarretados pela neuroinflamação, que levam à uma sinalização disfuncional de leptina e insulina, resultam em aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético, que culmina no fenótipo obeso.

## **1.2 Micróglia**

A neuroinflamação é o processo de ativação de células do SNC e orquestrado por células imunes residentes, como a micróglia. Tipicamente, o processo neuroinflamatório é desencadeado pela presença de toxinas, infecções, injúrias e autoantígenos. A micróglia é o macrófago residente do sistema nervoso central, responsável pela manutenção da homeostase tecidual, imunovigilância e resposta a injúrias [38]. Assim como os demais macrófagos residentes teciduais, como as células de Kupffer (fígado) e células de Langerhans (epiderme), a microglia não é derivada de células tronco hematopoiéticas, mas sim de progenitores eritromielóides na fase fetal [38]. Os progenitores dos macrófagos residentes se desenvolvem no saco vitelínico em estágios iniciais do período embrionário, e colonizam o tecido em que permanecerão posteriormente [38]. Desta forma, estes macrófagos são classificados como células de vida longa (do inglês *long lived macrophages*), uma vez que a sua taxa de substituição é extremamente baixa, e nos tecidos em que estão presentes um conjunto de seus progenitores é mantido para que se autorenovem [38].

A micróglia ativamente molda a arquitetura do SNC no início do período embrionário interagindo diretamente com os neurônios, na ausência das demais células da glia [39]. A contribuição mais notória da micróglia no período embrionário é o controle do número e destino de neurônios no SNC, através com da indução de apoptose de progenitores neurais e o engolfamento de células mortas [40-42]. A micróglia também é capaz de promover a proliferação e maturação de células tronco neurais[39, 43, 44]. No cérebro adulto, a micróglia apresenta diversas funções, que contemplam a imunovigilância, apoptose de células mortas e participação na modulação de sinapses [38] .

Os macrófagos periféricos e residentes podem apresentar um grande espectro de fenótipos, sendo melhor caracterizados dois estados de ativação, denominados M1 (ativação clássica) ou M2 (ativação alternativa) [45-49]. O primeiro apresenta ativação através da sinalização das citocinas do perfil Th1 (como o Interferon gama) e produzem citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$ , il-1 $\beta$ , IL-6). As citocinas do perfil Th2 (como por exemplo IL-4 e IL-13) induzem a polarização para o perfil M2, que possui funções reparadoras [45-49]. No caso da micróglia, a polarização para um perfil M1 é extremamente precoce na obesidade induzida por dieta em relação aos macrófagos de outros órgãos metabolicamente relevantes, havendo relatos de ativação do perfil inflamatório após um dia de consumo de dieta hiperlipídica [50].

No SNC, além da regulação da homeostase energética, as melanocortinas – peptídeos clivados a partir de POMC – apresentam ação anti-inflamatória, através da sinalização dos receptores de melanocortina (MCRs) [51-54]. Acredita-se que tais peptídeos possam afetar o perfil inflamatório através de quatro mecanismos em macrófagos periféricos: inibição da expressão de

citocinas pró-inflamatórias, através da inibição da sinalização de TLR2 e TLR4 [51] inibição da quimiotaxia para leucócitos [52], indução da expressão de citocinas anti-inflamatórias [53] e aumento de fagocitose [54]. Apesar de tais relatos, o papel de melanocortinas no contexto da inflamação orexigênica é inexplorado até então.

Existem cinco receptores para as melanocortinas descritos (MCR1-5), com particularidades em sua distribuição tecidual, bem como afinidade por diferentes ligantes [55]. O  $\alpha$ -MSH possui afinidade pelo MC1R (presente em melanócitos e implicados com a pigmentação do indivíduo), MC3R e MC4R, sendo esses dois últimos implicados com a obesidade [56]. A ligação do  $\alpha$ -MSH com estes receptores é responsável pelo aumento citoplasmático de adenosina 3',5' – monofosfato cíclico (AMPC), que ativará a cascata de sinalização mediada pela Proteína Kinase A [57]. Porém, não existem dados que apontem qual receptor de melanocortina é responsável pela regulação imune no SNC.

### **1.3 Imunometabolismo**

Estudos recentes têm demonstrado que o metabolismo celular é essencial na montagem da resposta imune [58-72]. Alterações no metabolismo celular dão suporte para que efetores funcionais da resposta inflamatória sejam sintetizados, que células migrem para o seu destino de atuação e permitem que o programa transcricional da resposta imune seja implementado. O imunometabolismo surgiu como uma fronteira de conhecimento que integra os conhecimentos de disciplinas historicamente distintas: o metabolismo e a imunologia. O objetivo desta disciplina é a investigação de como as adaptações

metabólicas afetam o fenótipo de células imunes e suas implicações para o desenvolvimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação dessas células.

Sabe-se que o metabolismo celular não é estático, mas sim um processo dinâmico que permite às células adaptarem-se a mudanças no ambiente [5] e foram descritas diferenças no metabolismo das células do sistema imune em seu estado basal e após a ativação. Macrófagos ativados com LPS, assim como macrófagos do perfil M1, apresentam aumento significativo da via glicolítica para a geração de ATP, com concomitante interrupção do metabolismo mitocondrial [58,59]. O aumento da glicólise tem como racional a rápida velocidade de indução desta via [60]. Apesar de amplamente descrito o aumento da glicólise em macrófagos M1, os mecanismos que elucidam o elo entre reprogramação metabólica e modulação da função efetora ainda não são compreendidos.

Paralelamente, a interrupção do metabolismo mitocondrial (ciclo de Krebs – TCA) permite que as células acumulem intermediários metabólicos, utilizados posteriormente para a síntese de mediadores inflamatórios; com destaque para citrato, itaconato e succinato [58,59]. O acúmulo de citrato leva à lipogênese, em que espécies lipídicas pró-inflamatórias são produzidas, e permite a produção de óxido nítrico (NO) [60]. O acúmulo de succinato promove o perfil pró-inflamatório por diferentes mecanismos. O acúmulo de succinato aumenta sua oxidação, o que acarreta em maior produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mROS) e consequente estabilização do fator induzido por hipóxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), promovendo o perfil pró-inflamatório [61,62]. O succinato também pode ser secretado por macrófagos, e, posteriormente

recaptados/reciclado, também atuando na manutenção do fenótipo inflamatório [63].

Além da indução da via glicolítica, macrófagos M1 apresentam elevado fluxo na via das pentoses (PPP), via metabólica necessária para a conversão de açúcares em nucleotídeos ou proteínas. Esta indução permite a biossíntese de lipídeos, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em um mecanismo dependente da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS2) [64-66]. Tais modulações metabólicas permitem que a célula adquira um potente fenótipo pró-inflamatório e atividade microbicida [64-66].

Recentemente, diversos trabalhos demonstraram que a atividade de enzimas glicolíticas suporta o fenótipo de macrófagos M1/ativados com LPS (67-72). A enzima piruvato kinase 2 (PKM2), responsável pela conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, também possui papel fundamental na promoção do perfil pró-inflamatório, através da indução de transcrição de interleucinas (IL-6, IL-1 $\beta$ ) (67,68), sendo dependente do fator induzível por HIF-1 $\alpha$ , um fator de transcrição conhecido por ser aumentado em células pró-inflamatórias [68]. Além da indução transcricional, relatos associam a atividade de PKM2 com a clivagem de IL-1 $\beta$ , um mecanismo dependente da maquinaria do inflamassoma [71].

A enzima 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-bifosfatase-3 (PFKFB3), que converte frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, também participa da reprogramação metabólica de macrófagos. Sua atividade promove a capacidade anti-viral das células, uma vez que permite a produção de mediadores que induzirão a captação e eliminação de células infectadas e/ou

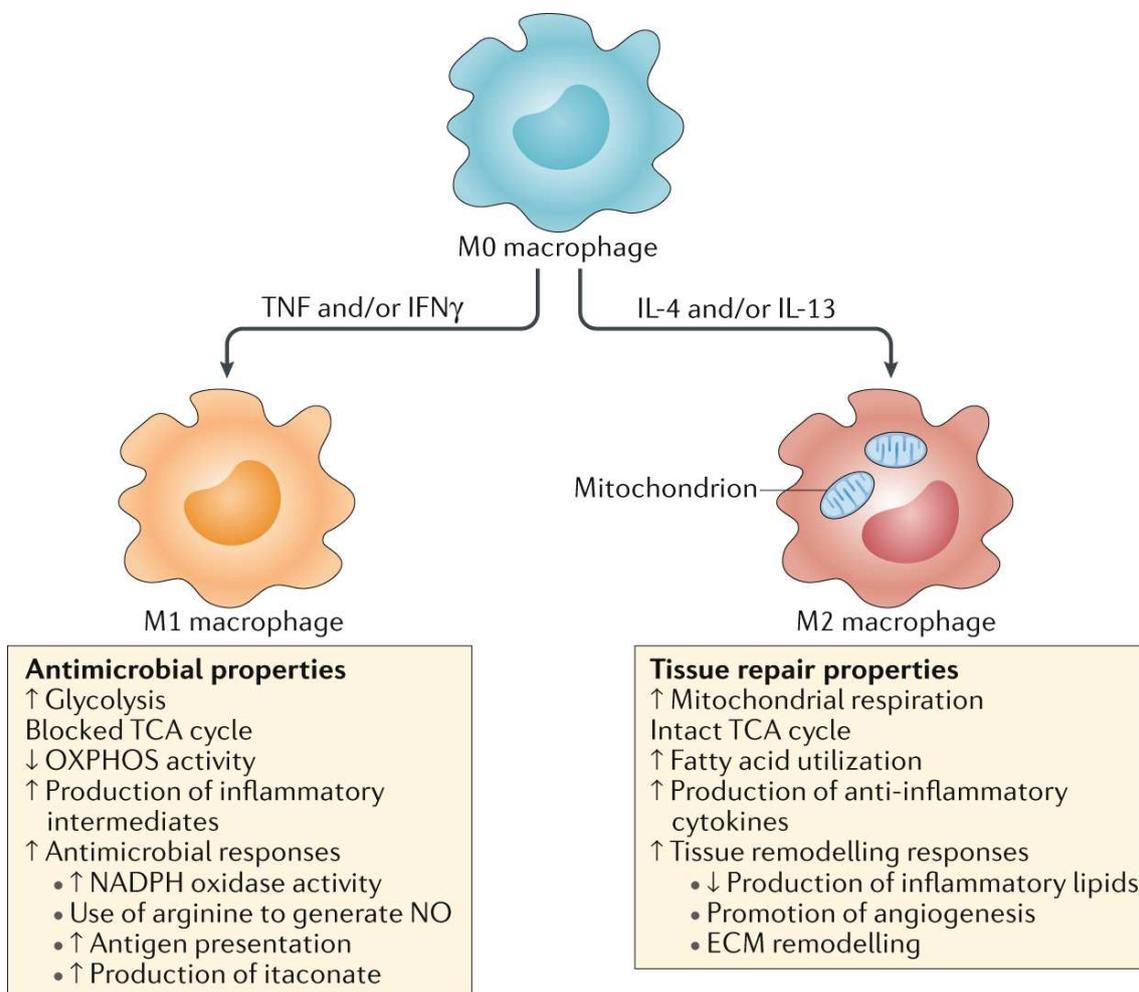
mortas [69]. Finalmente, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), também regula positivamente o perfil inflamatório atuando como fator de transcrição da citocina TNF-  $\alpha$  [70]. Tais alterações metabólicas, estão sumarizadas na Figura 1.

No entanto, apesar de amplamente descrito o aumento da glicólise em macrófagos M1, os mecanismos que elucidam o *link* entre reprogramação metabólica e modulação da função efetora estão em processo de descoberta [72].

Macrófagos M2 apresentam um perfil metabólico distinto de macrófagos M1 ou ativados com LPS [73-80]. Tais macrófagos apresentam indução e dependência da glicólise, mas não como fonte de ATP. Alguns trabalhos demonstram que o programa transcricional típico de macrófagos M2 é dependente da glicólise [73,74]. Em contraste com macrófagos M1 (ou ativados com LPS), macrófagos M2 apresentam TCA integro e indução de fosforilação oxidativa mitocondrial a fim de obtenção de energia. Acredita-se que a indução da glicólise seja necessária para tais células para a geração de acetil-CoA, um intermediário do metabolismo celular, que é diretamente utilizado em modificações epigenéticas necessárias para o programa transcricional de células anti-inflamatórias [74]. Existe um grande debate em relação ao substrato utilizado para abastecer o metabolismo mitocondrial em macrófagos M2. Estudos iniciais apontavam que a oxidação de ácidos graxos era fundamental para o fenótipo M2 [75,76], mas dados recentes questionam a metodologia empregada, e modelos genéticos de deleção de enzimas essenciais para a oxidação de ácidos graxos não corroboram a necessidade desta via metabólica para o perfil M2 [77,78]. Ip e colaboradores [79]

demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios da interleucina 10 (IL-10) em macrófagos são dependentes de reprogramação metabólica que promove o metabolismo mitocondrial. Estudos do nosso laboratório demonstram que a inibição do perfil inflamatório em macrófagos são dependentes de proteção ultraestrutural e funcional da mitocôndria [80].

Apesar de sua relevância para a homeostase do sistema nervoso central,



poucos trabalhos exploram o imunometabolismo de micróglia até então [81-88].

Desta forma, os presentes estudos extrapolam os achados em macrófagos para a micróglia.

Figura 1: Esquema da reprogramação metabólica característica de macrófagos polarizados com o perfil M1 ou M2, respectivamente. O perfil M1 é adquirido com a exposição à

citocinas/interleucinas pró-inflamatórias (como INF $\gamma$  e TNF), bem como LPS e leva a indução da via glicolítica e atividade anti-microbicial. Em contraste, macrófagos M2 é adquirido com a sinalização de IL-13/IL-4 e apresentam aumento de metabolismo mitocondrial. EMC = matriz extracelular; NO = óxido nítrico; OXPHOS: fosforilação oxidativa; TCA: ciclo do ácido tricarboxílico. Retirado de Russel e colaboradores [89].

## **2. Justificativa**

Pacientes obesos apresentam elevadas taxas de recorrência quando submetidos a abordagens comportamentais e farmacológicas destinadas ao controle do peso. Mesmo pacientes submetidos a cirurgia bariátrica tem recorrência superior ao que seria esperado considerando o grau de intervenção ao qual são submetidos. Estudos realizados nos últimos 10 anos revelaram que tanto modelos animais quanto humanos obesos apresentam perdas funcionais e estruturais no hipotálamo, decorrentes da instalação de um processo inflamatório no hipotálamo. Desta forma, a busca por mecanismos de resolução do processo neuroinflamatório tornam-se de extrema importância como abordagem terapêutica à obesidade. Hipotetizamos que a disfunção de neurônios POMC é um dos eventos necessários para a perpetuação e intensificação do sinal inflamatório no hipotálamo, uma vez que ocorre diminuição dos níveis hipotalâmicos de  $\alpha$ -MSH em indivíduos obesos. Desta maneira, investigamos o se o tratamento com o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH promove alterações na função efetora da micróglia, e se tais alterações metabólicas são dependentes de mecanismos imunometabólicos.

## **3. Objetivos**

Determinar a participação da sinalização de  $\alpha$ -MSH no perfil inflamatório da micróglia por:

- Avaliar o impacto do tratamento com o neuropeptídeo na produção de citocinas e atividade fagocítica das células;
- Determinar o receptor envolvido na sinalização do neuropeptídeo na micróglia;
- Avaliar se as ações do neuropeptídeo são dependentes de mecanismos imunometabólicos.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6J wild-type (WT) obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – CEUA 4814-4. Os animais foram acondicionados em microisoladores coletivos, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C e com suprimentos de água e alimento autoclavados *ad libitum*. Os animais foram mantidos no Biotério SPF do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia Unicamp. Os animais foram sacrificados de 4 a 8 dias após seu nascimento, quando utilizados para obtenção de células para experimentos em cultura celular. Animais submetidos à dieta obesogênica foram sacrificados com 12 semanas de idade

### **4.2 Cultivo Celular**

*Linhagem celular BV2*

A linhagem BV-2 foi empregada nos experimentos, cultivadas com meio RPMI 1640, suplementado com 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Thermo Scientific), 10000 U/mL de penicilina (Gibco) e 10 ng/mL streptomina (Gibco). Ao atingir confluência de 80% as células foram tripsinizadas, plaqueadas em placas apropriadas para microscopia e destinadas para o experimento de *Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy*.

#### *Micróglia primária murina*

Células primárias da micróglia foram isoladas de cérebros de camundongos neonatos – 3 a 5 dias de vida. Os animais foram anestesiados com isofluroano, decapitados e o encéfalo foi retirado. O tecido foi dissociado mecanicamente, cérebros foram dissociados mecanicamente, homogenizadas e passadas por um cell strainer de 40 $\mu$ M. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 1000 RPM, ressuspendidas em meio completo para a geração da cultura mista de células da glia (astrócitos e micróglia), e quando esta cultura atingiu 90% de confluência foi adicionado ao meio 30% (v/v) de meio condicionado de L929 por dois dias para induzir a proliferação de micróglia. Após esta etapa as células foram dissociadas mecanicamente, sendo, então, possível a cultura com alta pureza de micróglia; as células, então, ficaram em meio completo por cinco dias consecutivos, e após esse período as células estavam prontas para a realização de experimentos.

#### *Micróglia primária humana*

A obtenção de micróglia primária de humanos foi realizada a partir de amostras de autópsias realizadas no Nederlands Herseinstituut, em Amsterdã. No momento da autópsia uma porção do cortex occipital foi dissecada e colocada

em meio Hibernato A (Invitrogen) e armazenadas em 4°C até o processamento. Os vasos do tecido e as meninges foram dissecados e descartados, realizada a dissociação mecânica com aparatos cirúrgicos. A dissociação mecânica foi seguida por uma dissociação enzimática com tripsina (Invitrogen), na concentração final de 0,0125% em meio Hibernato A por 45 minutos, a 37°C em uma plataforma com agitação. A digestão enzimática ocorreu na presença de 33 µg/mL DNaseI (Roche). O processo de digestão enzimática foi inibido com a adição de FBS e a suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos 1800 RPM 4°C. O *pellet* de células foi ressuscitado em meio DMEM (Invitrogen) gelado, suplementado com 10%FBS e 1% coquetel de antibióticos. Adicionou-se Percoll 100% (GE) e as células foram submetidas à centrifugação 1800 RPM por 30 minutos. A seleção positiva de micróglia ocorreu através de microbeads magnéticas (Miltenny) – e realizada de acordo com as instruções do fabricante. Células vivas foram contadas e plaqueadas em Labteks (ThermoFisher), previamente tratadas com poli-D-lisina (ThermoFisher) 15 µg/mL. As células foram tratadas como descrito a seguir.

### *Tratamentos*

Células foram tratadas com o sintético recombinante [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]-α-Melanocyte Stimulating Hormone na concentração de 1µM e designadas no texto como “α-MSH”. A ativação com LPS (Sigma, *E. coli* 0111:B4) foi realizada na concentração de 100ng/mL. Em células co-tratadas com α-MSH e LPS, o tratamento com α-MSH foi realizado 45 minutos antes do estímulo com LPS. O bloqueio químico do receptor de melanocortina 1 foi realizado com o químico MSG606 (R&D) na concentração de 10 µM e o bloqueio do receptor de

melanocortina 3, com o SHU9119 (Cayman Chemicals), 10  $\mu$ M. Ambos administrados na cultura 45 minutos anteriores ao tratamento com  $\alpha$ -MSH.

Para a inibição da glicólise foi utilizado o sintético 2-deoxy-glicose (Sigma), 5 mM. Para a inibição do transporte de piruvato para a mitocôndria, o UK5099 (Cayman Chemicals) 10  $\mu$ M. Ambos os tratamentos realizados 1 hora anterior aos estímulos com o neuropeptídeo ou LPS. As células foram avaliadas após seis horas de tratamento, contadas a partir do estímulo com LPS. Células humanas foram ativadas com TNF-  $\alpha$  recombinante (R&D) 50 ng/mL e analisadas após 4 horas.

### **4.3 Citometria de Fluxo**

As diferentes amostras de células foram processadas para identificação de moléculas de superfície e intracelulares. A leitura das amostras foi realizada no equipamento BD FACSVerser (BD Biosciences), usando o software FACSuite (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados no software FlowJo (Tree Star, San Carlo, CA). Para a marcação de citocinas intracelulares, as células foram tratadas com PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e Ionomicina (500 ng/ml; Sigma-Aldrich) por 4 horas, com adição de Brefeldina A (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) nas últimas 3 horas. Posteriormente, foi utilizado o kit BD Cytotfix/Cytoperm™ conforme descrito pelo fabricante (BD Bioscience) para fixação e permeabilização das células. Para os experimentos de função mitocondrial foi utilizado o marcador MitoTracker™ Red CMXRos (Thermofisher) para detecção de mitocôndrias com potencial de membrana. A marcação foi feita conforme descrito pelo fabricante. Os conjugados de anticorpo-fluorocromo (BD/ Biolegend) estão especificados na Tabela 1.

Tabela1: Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo

Proteína	Fabricante	Clone	Fluorocromo
F4/80	Biolegend	BM8	BV421
F4/80	Biolegend	BM8	PB
CD11b	Biolegend	M1/70	APC/Cy7
TNF- $\alpha$	Biolegend	MP6-XT22	PE/Cy7
IL-1 $\beta$	Biolegend	NJTEN3	PE
IL-12	Biolegend	C15.6	APC
p-ATF1 (S63)	BD	90038551	APC

#### 4.4 Dosagem Extracelular de Citocinas

O ensaio de ELISA foi utilizado para quantificar as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6. Os kits utilizados foram das empresas Biolegend ou BD Bioscience e realizados conformes instruções dos fabricantes. As amostras foram provenientes de sobrenadantes de cultura primária de micróglia com seus respectivos tratamentos previamente descritos. As amostras tiveram um fator de diluição de 25 vezes e foram lidas nas absorvâncias de 450nm e 570 nm no aparelho Synergy HT Biotek.

#### 4.5 PCR em tempo real

O RNA proveniente das culturas celulares ou do hipotálamo foi extraído utilizando-se o kit RNEasy (Qiagen) e quantificado através de espectrofotometria no aparelho Nanodrop (Beckman, Fullerton, CA). Após constatação de qualidade e pureza, a transcrição reversa do mRNA em cDNA foi realizada com 500ng de RNA total utilizando-se o kit Go Script Reverse

Transcriptase (*Promega Corporation*), conforme descrito pelo fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o RT Real Time™ SYBR Green/ROX PCR master mix (SABioscience) e os equipamento Perkin-Elmer ABI Prism 7500 *Sequence Detection System*. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi realizado pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e utilizando como gene de referência o 18S. O resultado foi calculado com a fórmula  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  da amostra teste –  $\Delta C_t$  da amostra controle, onde  $\Delta C_t = C_t$  gene estudado –  $C_t$  18s (gene constitutivamente expresso, utilizado como controle interno da reação). A sequência dos genes utilizados estão na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos genes-alvo avaliados.

Gene	Foward (3'5')	Reverse (3'5')
MC1R	TGG GCA TCA TTG CTA TAG ACC GCT	AAC GGC TGT GTG CTT GTA GTA GGT
MC3R	CTG CTG CCT GTC TTC TGT TTC T	AGA GAA TCT CCT TGA ACG TGT TG
MC4R	CGG ACG GAG GAT GCT ATG AG	CGC CAC GAT CAC TAG AAT GTT
MC5R	CAA GAC CAG AGC CCG GTA AAC CAG	GCG CAA AGG TAA GCA TGA TTC T
NOS2	TGG TGA AGG GAC TGA GCT GT	CCA ACG TTC TCC GTT CTC TTG
TNF- $\alpha$	TAG CCC ACG TCG TAG CAA AC	TGT CTT TGA GAT CCA TGC CGT
IL-1 $\beta$	GGC AGC TAC CTG TGT GTC TTT CCC	ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG
IL-12	ATG ACC CTG TGC CTT GGT AG	CTG AAG TGC TGC GTT GAT GG
IL-6	CTC TGC AAG AGA GACT TCC ATC CA	TTG TGA AGT AGG GAA GGC CG
18S	CTC AAC ACGG GAA ACC TCA C	CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG

#### 4.6 Imunofluorescência

Após os tratamentos descritos, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4%, por 10 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas

com tampão PB e posteriormente imersas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos, e novamente lavadas com tampão PB. As células foram incubadas com solução de bloqueio (Albumina sérica bovina 5%, 0,1% Triton) por 40 minutos em temperatura ambiente, seguida de incubação *overnight* com os anticorpos primários (MC3R, Santa Cruz Biotechnology, #sc8990 1:100; COXIV, ThermoFisher, # 60251-1-IG 1:250), diluídos em solução de bloqueio. No dia seguinte, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com AF546 ou AF647 (Life Technologies). Em seguida as células foram lavadas, imersas em solução contendo o marcador nuclear DAPI (#D1306, Thermo Scientific, MA, USA) e cobertas com meio de montagem Prolong (LifeTechnologies). As imagens foram obtidas usando um Microscópio Confocal à laser (SP5, LEICA).

#### **4.7 Ensaios de Atividade Metabólica**

As células foram coletas após os tratamentos descritos e  $2,0 \times 10^5$  células foram plaqueadas em microplacas de 24 poços do kit Xfe96 em meio próprio para o ensaio de glicólise (Glycolytic Stress) ou ensaio de funcionalidade mitocondrial (MitoStress) (RPMI modificado para o ensaio de XF), ambos provenientes da Seahorse Biosciences (Agilent Technologies), suplementados de acordo com as instruções do fabricante. A microplaca foi incubada por 60 minutos a 37°C em estufa sem CO<sub>2</sub> e submetidos a análise da taxa acidificação do meio extracelular (ECAR) e taxa de consumo de oxigênio (OCR) em tempo real no analisador de fluxo extracelular da Seahorse XF96. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Seahorse biosciences) utilizando as subseqüentes injeções de glicose (10mM), oligomicina (1μM) e 2-deoxiglicose (2-DG, 50mM). FCCP (1,5 μM) e

rotenona/actinomicina (0,5  $\mu$ M de cada). Os dados foram analisados pelo software Wave Desktop (Agilent Technologies).

#### **4.8 Fluorescent Lifetime Microscopy**

Células BV2 foram colocadas em cultura e submetidas aos tratamentos descritos. Para as medidas, as células foram lavadas e mantidas em meio sem fenol red (Gibco). A autofluorescência das células foi determinada com o uso do microscópio confocal Zeiss LSM780 NLO. O primeiro parâmetro adquirido foi uma curva de emissão espectral. Posteriormente, o espectro obtido foi submetido a uma deconvolução espectral para garantir a análise dos maiores contribuidores para a autofluorescência. A meia vida da fluorescência foi determinada utilizando o sistema Becker & Hickel TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting) e as curvas analisadas com o uso do software SPCImage (Becker & Hickl).

#### **4.9 Captação de Glicose**

As células foram incubadas em meio completo com 50 $\mu$ M do 2-NBDG (Thermo) e os anticorpos de superfície e *live/dead*, durante 1h a 37°C, seguindo as instruções do fabricante. Após lavagem com meio, as células foram ressuspensas em PBS+2% soro fetal bovino e a captação de 2-NBDG foi detectada no equipamento BD FACSVerser.

#### **4.10 Microscopia eletrônica de transmissão:**

Foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Uma monocamada celular crescida sobre lamínula de vidro foi fixada com glutaraldeído a 2,5% em cacodilato de

sódio a 0,1 M e tampão de CaCl<sub>2</sub> a 3 mM e incubada por 1 h em gelo. Após a fixação, as amostras foram lavadas em cacodilato de sódio 0,1 M e tampão CaCl<sub>2</sub> 3 mM e fixadas com tetróxido de ósmio 2% em cacodilato de sódio 0,1 M e tampão CaCl<sub>2</sub> 3 mM por 30 min e mantidas em acetato de uranila 2% no freezer durante a noite. As células foram desidratadas em etanol em gelo. As células desidratadas foram infiltradas em resina Epon e colocadas em estufa a 60 ° C para polimerização por 72 horas. Lâminas ultrafinas de células foram cortadas com um micrótomo Leica Ultracut, coradas com acetato de uranila a 2% e citrato de Reynold e examinadas num microscópio eletrônico de transmissão LEO 906-Zeiss a uma tensão de aceleração de 60 kV.

#### **4.11 Injeções Estereotáxicas**

Os animais foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal da mistura de cloridrato de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Realizou-se a tricotomia e antissepsia da cabeça do animal e a mesma foi fixada ao aparelho estereotáxico (Model 900LS (Lazy Susan) Small Animal Stereotaxic Instrument, Kopf), encaixando as orelhas nos pinos de fixação. Os dentes incisivos foram encaixados com o mínimo de inclinação anteroposterior. Realizou-se a incisão na pele seguindo o plano sagital mediano da altura dos olhos até as orelhas de aproximadamente 1,5 cm de extensão. Com auxílio de um cotonete, o perióstio foi divulsionado e a região foi higienizada com água oxigenada 5%. O bregma foi localizado e a cânula guia (23 gauge com 14 mm de comprimento) já fixada na haste do estereotáxico, foi rebaixada até encostar na região da intersecção das suturas frontal e temporal. As medidas: anteroposterior (AP), lateral (L) e dorsoventral (DV) -7.18mm foram anotadas. A região do lambda foi localizada e os procedimentos realizados no bregma

foram repetidos. Verificamos a diferença entre as alturas medidas no bregma e no lambda, e no caso desta exceder o valor de 0,2 cm, a inclinação anteroposterior da cabeça do animal foi ajustada. O posicionamento da cânula retornou ao bregma e abaixamos na intersecção para confirmar a exatidão da posição. A partir desse ponto, alcançamos as coordenadas do 3º ventrículo sendo estas, AP -1,7 mm, L - 0.2 mm e DV -5.2 mm de acordo com o Atlas Paxinos-Watson, e estudos prévios. Após o deslocamento da haste até a posição determinada pelas coordenadas anteroposterior e mediolateral, abaixamos a haste até que a ponta da agulha alcançasse o osso e marcamos a região com caneta. Realizamos a trepanação do local com auxílio da broca diamantada ponta esférica (FG All-Prime), acoplada ao micromotor elétrico (Micromotor elétrico LB 100, Beltec) em baixa rotação. A microseringa foi abaixada até atingir a altura da dura-máter e posteriormente foi rebaixada até a coordenada DV estabelecida para o 3V. Foi realizada injeção única com  $\alpha$ -MSH (2 $\mu$ L) 1 $\mu$ M. Os camundongos foram sacrificados seis horas após a injeção, o encéfalo retirado e processado para avaliação da expressão gênica.

#### **4.12 Análises Estatísticas**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Após checar a distribuição de todos os dados, eles foram analisados por teste-t de Student ou por ANOVA de uma variável, seguida pelo teste de Tukey ou pela ANOVA de duas variáveis seguida do método de Holm-Sidak para determinar a significância das diferenças individuais. O nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$  e os dados foram analisados usando o programa estatístico GraphPAD

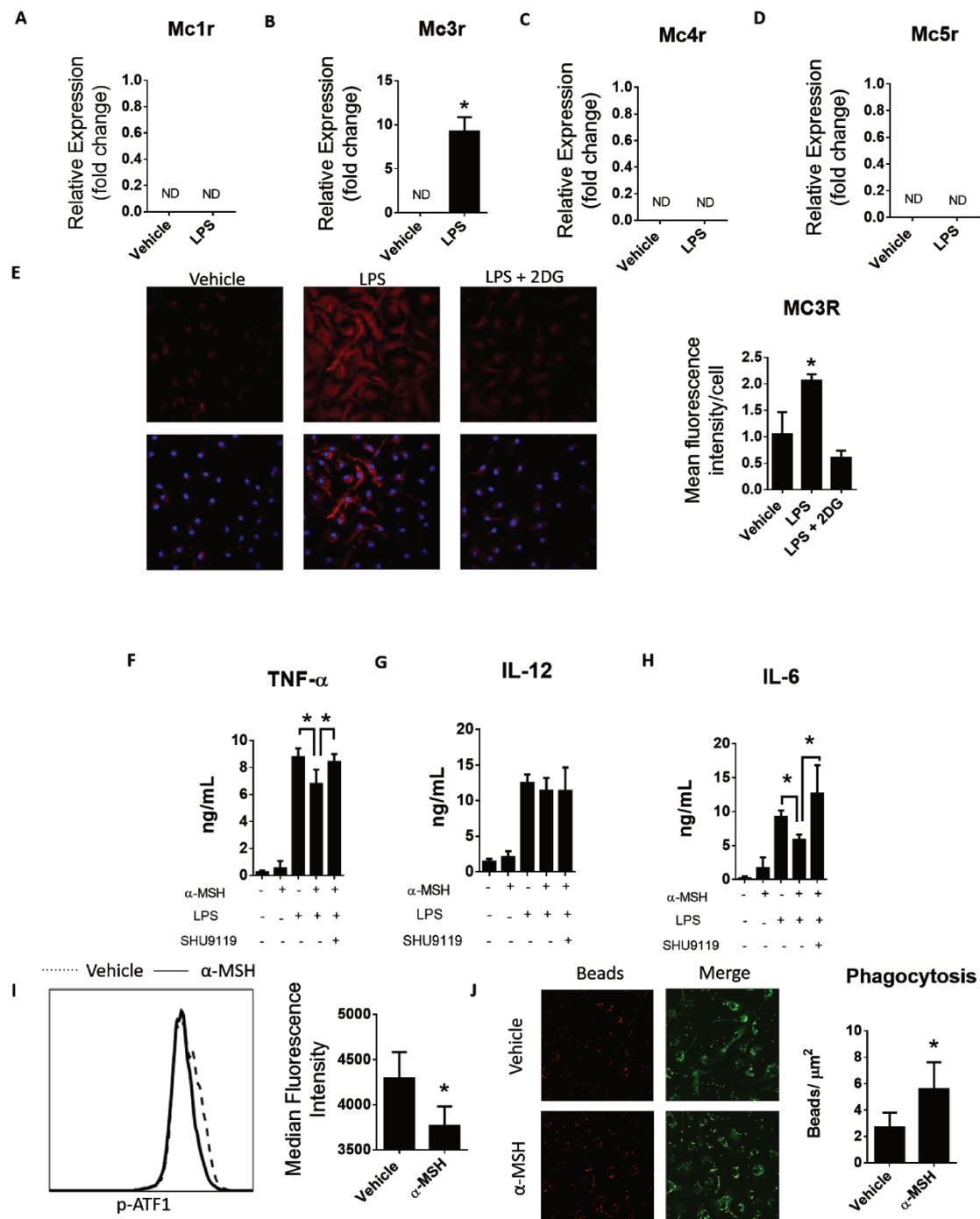
## 5. Resultados

### 5.1 $\alpha$ -MSH exerce efeitos imunoreguladores através do MC3R

Tendo em vista que a molécula de  $\alpha$ -MSH liga-se a diversos receptores de melanocortina (MC1R, MC3R, MC4R, MC5R), investigamos se frente a um estímulo inflamatório clássico (LPS – 6 horas) há modulação na expressão desses receptores. Observamos que células não ativadas não apresentam expressão detectável de nenhum dos receptores citados e apenas o MC3R apresenta expressão induzida com a ativação por LPS (Figura 2 A-D). A expressão proteica do MC3R também foi avaliada através de microscopia confocal e a ativação com LPS leva ao aumento da expressão do MC3R (Figura 2E). A fim de compreender se a modulação da expressão do MC3R é dependente de um mecanismo imunometabólico, utilizamos uma abordagem glucoprivativa através da adição do composto 2-DG, previamente à ativação com o LPS. O tratamento com 2-DG reverteu a indução da expressão de MC3R induzida pelo LPS (Figura 2E).

Em seguida, investigamos o papel do MC3R nos efeitos imunoreguladores do  $\alpha$ -MSH, o único receptor de melanocortina em que detectamos modulação frente ao estímulo inflamatório. Diversos estudos relacionam a atividade do MC3R como o responsável pelos efeitos anti-inflamatórios descritos da sinalização melancortinérgica em macrófagos periféricos [90-92]. A fim de determinar a partição do MC3R na sinalização em micróglia, utilizamos o inibidor químico SHU-9119, um potente antagonista do MC3R e MC4R [73, 79, 93-105]. A inibição química do MC3R alterou o padrão de citocinas secretadas pela micróglia co-tratada com  $\alpha$ -MSH e LPS (Figura 2 F-H).

Observamos que o tratamento com  $\alpha$ -MSH inibiu a secreção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS (Figura 2F), uma das citocinas mais relevantes na neuroinflamação hipotalâmica [96]. O tratamento com  $\alpha$ -MSH diminui a secreção de IL-6 e TNF- $\alpha$  induzida por LPS, sem alterar a secreção de IL-12 (Figura 1.F-H). No entanto, o tratamento com SHU-9119 retorna o padrão de secreção de citocinas ao das células ativadas com LPS. Nossos dados também demonstraram que o tratamento com  $\alpha$ -MSH reduziu a fosforilação de ATF-1 (do inglês, Activating Transcription Factor 1) (Figura 2I), um importante componente da sinalização pró-inflamatória, especialmente mediada pelo Toll-like receptor 4 (TLR4) [97 - 99]. Adicionalmente, avaliamos o impacto do tratamento com  $\alpha$ -MSH na atividade fagocítica (Figura 2J) e observamos que o  $\alpha$ -MSH aumentou a atividade fagocítica da micróglia, comumente associada com um fenótipo mais anti-inflamatório [100]. Desta forma, podemos concluir que os efeitos imunoreguladores do  $\alpha$ -MSH são dependentes do MC3R e que o tratamento com o neuropeptídeo foi capaz de induzir a atividade fagocítica e reduzir a secreção das citocinas pró-inflamatórias, as quais encontram-se elevadas em hipotálamo de indivíduos obesos [34,35,44].



**Figura 2:  $\alpha$ -MSH exerce efeitos imunoreguladores através do MC3R.** Análise da expressão dos receptores de melanocortina em micróglia frente ou não à ativação. Avaliação do impacto do tratamento com o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH na função efetora da micróglia, com inibição química do receptor de melanocortina 3 (SHU9119 - 10 $\mu$ M). Expressão gênica de Mc1r (A), Mc2r (B), Mc3r (C) e Mc4r (D) em células controles ou ativadas com LPS (100ng/mL). Expressão proteica de MC3R avaliada por microscopia confocal (E) em células controle, ativadas com LPS, e ativadas com LPS mas previamente submetidas à uma abordagem glucoprivativa (2-DG, 5mM). Secreção de citocinas avaliada por ELISA frente aos tratamentos descritos TNF-  $\alpha$  (F), IL-12 (G), IL-6 (H). Nível de fosforilação de ATF-1 avaliado por citometria de fluxo após 30 minutos de estímulo com  $\alpha$ -MSH (I). Imagens representativas de ensaio de fagocitose por captação de microbeads (J). n= 3 – 5/ grupo. Resultados demonstrados como média +/- SEM, \*p<0,05, de acordo com Anova de uma via ou teste-T.

## 5.2 $\alpha$ -MSH limita a glicólise induzida por LPS

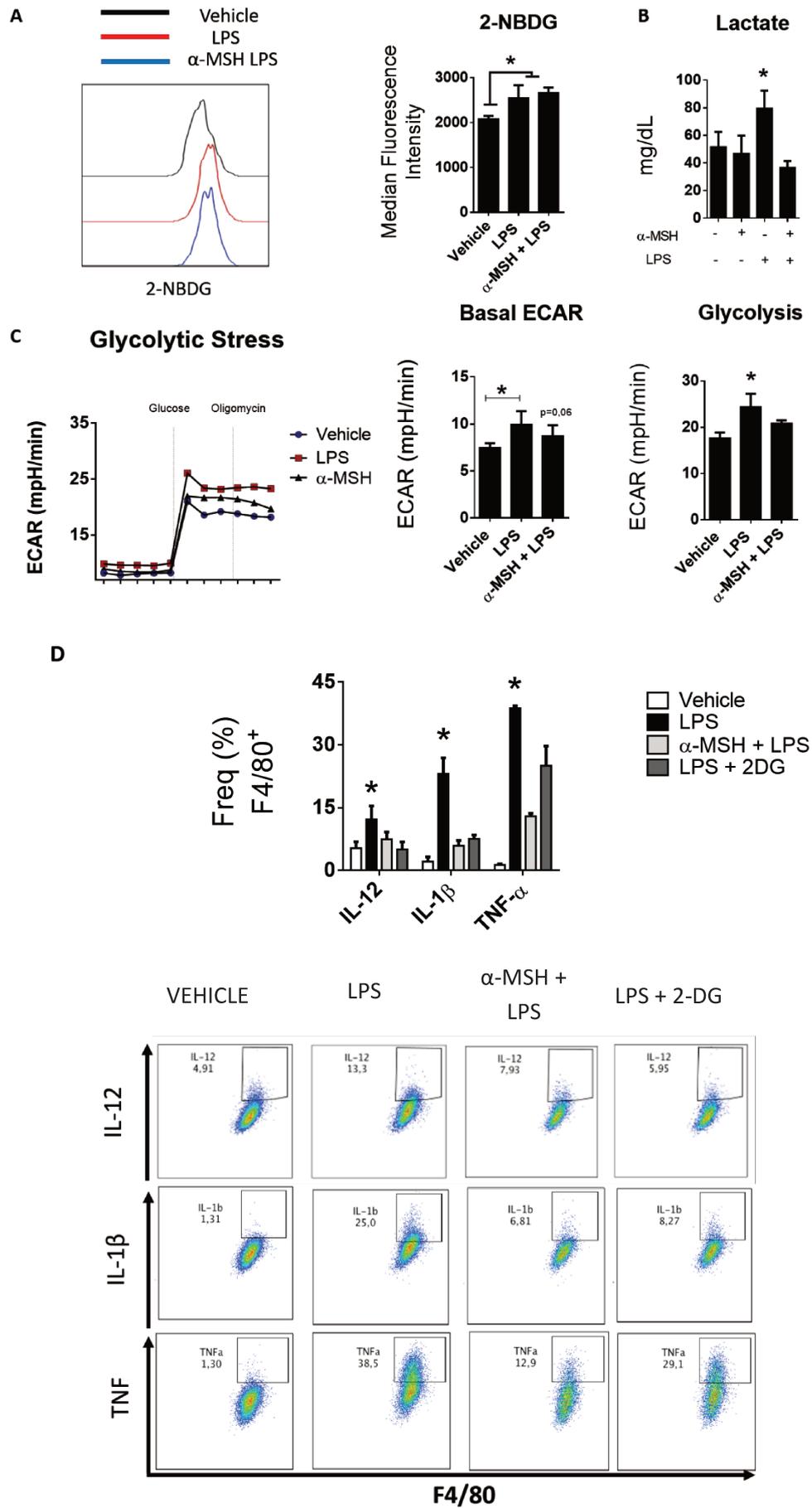
A resposta inflamatória leva à reprogramação metabólica da micróglia: células ativadas com LPS apresentam indução da via glicolítica, evidenciada pelo aumento da captação de glicose e da secreção de lactato e que pode ser monitorada por ensaios em tempo real. Desta forma, hipotetizamos que a atenuação do perfil inflamatório que observamos estaria associada com a redução da glicólise em células tratadas com  $\alpha$ -MSH.

A aquisição e montagem de um perfil pró-inflamatório em células do sistema imune está intimamente relacionado com a dependência da glicólise como fonte energética [52,53]. Essa mudança é necessária uma vez que uma elevada taxa glicolítica fornece intermediários metabólicos para a biossíntese de macromoléculas essenciais para a proliferação celular e/ou efetuação da resposta imune (citocinas) [54-57]. Desta forma, investigamos se as alterações na função efetora em células de micróglia primária frente ao tratamento com  $\alpha$ -MSH são dependentes de alterações imunometabólicas.

A captação de glicose, determinada através de ensaio com a molécula fluorescente 2-NBDG, está aumentada em micróglia ativada com LPS e o

tratamento com  $\alpha$ -MSH não altera a magnitude da captação em células co-tratadas (Figura 3A). A dosagem do lactato no sobrenadante das células, que é diretamente proporcional ao nível de glicólise anaeróbia, mostrou que a ativação com LPS leva a um aumento da glicólise, o qual é normalizado com o tratamento com  $\alpha$ -MSH (Figura 3B). A microgila também foi submetida ao teste de monitoramento do metabolismo em tempo real (Seahorse) (Figura 2C). Neste ensaio, a taxa de acidificação extracelular (ECAR) – que é proporcional aos níveis de lactato no sobrenadante celular – é avaliada. Dois pontos foram avaliados, (i) ECAR basal (medida de ECAR anterior à adição de qualquer componente modulador da via glicolítica nas células) e (ii) glicólise (aqui consideradas como o ECAR após à injeção de glicose nas células, de acordo com recomendação do fabricante do teste). Não foram considerados os dados de reserva glicolítica (ECAR após a injeção de oligomicina subtratido do ECAR basal (Figura 3C). Observamos que o ECAR basal estava aumentado em células ativadas com LPS, sendo reduzido com o tratamento com  $\alpha$ -MSH ( $p=0,06$ ), demonstrando que a glicólise aumentada foi revertida com o tratamento com  $\alpha$ -MSH (Figura 3C). Por outro lado, a inibição da glicólise através de uma abordagem glucoprivativa (2-DG) leva à inibição da resposta pró-inflamatória de macrófagos e à diminuição na secreção de citocinas [53-66]. Dessa forma, avaliamos e comparamos o padrão de secreção de citocinas de células ativadas com LPS, com ou sem glucoprivação, e co-tratadas com  $\alpha$ -MSH. O padrão encontrado foi que a secreção de citocinas inflamatórias induzida por LPS foi diminuído em magnitudes semelhantes tanto na presença do neuropeptídeo quanto com a abordagem glucoprivativa (Figura 3D); a ativação com LPS levou ao aumento da frequência de células produtoras de IL-

12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e o tratamento com o neuropeptídeo ou com o composto 2-DG reduziram significativamente a porcentagem de células produtoras de tais citocinas.



**Figura 3:  $\alpha$ -MSH limita a glicólise induzida por LPS.** Avaliação do perfil glicolítico de micróglia nos tratamentos propostos. Ensaio de captação de glicose fluorescente – 2-NBDG. Concentração de lactato no sobrenadante celular (B). Monitoramento do metabolismo da micróglia em tempo real – avaliação da taxa de acidificação extracelular ECAR (C). Expressão intracelular de citocinas em microglia controles, ativadas com LPS (com ou sem abordagem glucoprivativa) e cotratadas com  $\alpha$ -MSH e LPS (D). n= 3-5. Resultados demonstrados como média +/- SEM, \*p<0,05, de acordo com Anova de uma via ou teste-T.

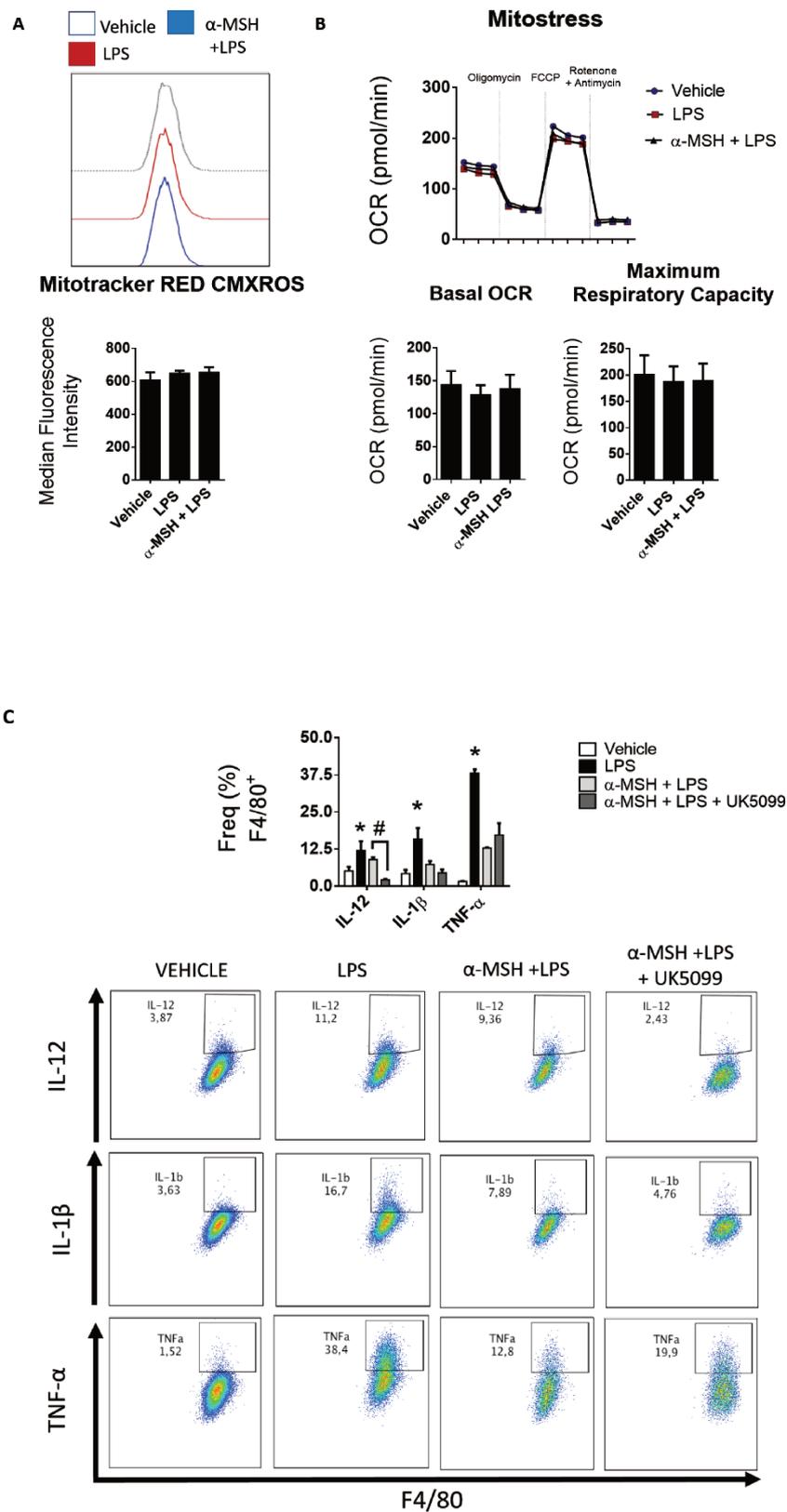
### **5.3 O tratamento com $\alpha$ -MSH não leva a alterações no metabolismo mitocondrial de micróglia**

A aquisição de um perfil anti-inflamatório está usualmente associada a uma reprogramação metabólica em que o metabolismo mitocondrial é favorecido [99-105]. Estudos iniciais indicavam a oxidação de ácidos graxos como a principal via metabólica em macrófagos M2 [102, 106], porém atualmente existe um grande debate da participação desta via metabólica para a função efetora destas células e destaque para o metabolismo de glicose direcionado para a fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) como o principal eixo metabólico engajado na reprogramação de células M2 [77, 107].

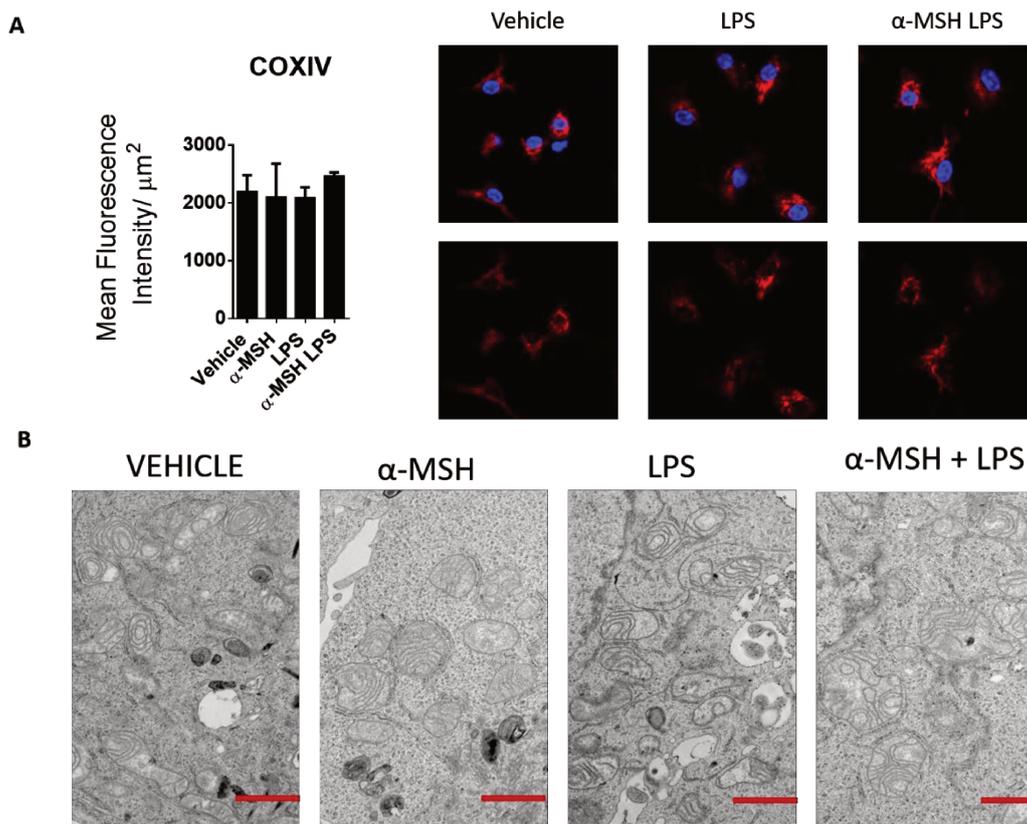
Uma vez observada a inibição do perfil pró-inflamatório, associado com a redução da glicólise anaeróbia, investigamos possíveis modulações no metabolismo mitocondrial frente ao tratamento com  $\alpha$ -MSH. Com o objetivo de determinar se a OXPHOS é diferencialmente regulada entre os tratamentos explorados, utilizamos a *probe* comercial Mitotraker Red CMXRos. O acúmulo da *probe* (e conseqüentemente a intensidade de seu sinal) é dependente de potencial de membrana mitocondrial; sendo assim, células em que existe maior OXPHOS apresentam maior metabolismo oxidativo. Observamos que nem a

ativação com LPS ou o co-tratamento com  $\alpha$ -MSH e LPS levaram a mudanças na intensidade do sinal da *probe* (Figura 4A). Em seguida, as células foram submetidas novamente ao teste de monitoramento do metabolismo em tempo real (Seahorse, Agilent) (Figura 4B). Porém, neste ensaio, a taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada. Dois pontos do teste comercial foram analisados: (i) OCR basal (medida de OCR anterior à adição de qualquer componente modulador do metabolismo mitocondrial nas células) e (ii) respiração máxima (OCR após à injeção de cianeto de carbonila-4-fenilhidrazona - FCCP nas células, de acordo com recomendação do fabricante do teste). Condizente com os dados de Mitotracker RED CMXRos, não houve modulação no OCR basal ou de respiração máxima (Figura 4B). Em seguida, inibimos quimicamente o transportador mitocondrial de piruvato com o composto UK5099, na intenção de bloquear o metabolismo oxidativo e avaliar o impacto desta inibição na produção de citocinas pela micróglia. Novamente, a ativação com LPS levou ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), que foi revertido pelo tratamento com  $\alpha$ -MSH; no entanto, a inibição da OXPHOS foi irrelevante nas células co-tratadas com  $\alpha$ -MSH e LPS (Figura 4C). Além disso, a expressão da enzima citrato c oxidase (COXIV), componente da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, permaneceu inalterada entre os grupos analisados (Figura 5A). Uma vez que forma e função da mitocôndria estão intimamente associadas [103], decidimos analisar se a morfologia mitocôndria apresentava alteração nos grupos estudados através de microscopia eletrônica. A ativação com LPS leva ao aparecimento de mitocôndrias sem cristas definidas, quando comparadas com o controle (Figura 5B), assim como descrito anteriormente [80]. O tratamento com o

neuropeptide não promoveu alterações morfológicas causadas pela ativação com LPS (Figura 4B).



**Figura 4:  $\alpha$ -MSH apresenta efeitos imunoreguladores independente da função mitocondrial.** Avaliação do metabolismo mitocondrial de micróglia nos tratamentos propostos. Avaliação do metabolismo mitocondrial através do uso de probe comercial para o potencial de membrana mitocondrial, ensaio de atividade metabólica (Mitostress). A repercussão na função efetora da micróglia foi realizada através de avaliação da produção das citocinas por citometria de fluxo, com os tratamentos LPS, co-tratadas com  $\alpha$ -MSH (1 $\mu$ M) e com o inibidor do metabolismo mitocondrial UK5099 (10 $\mu$ M). (A) MFI mitotracker RED CMXRos; (B) Mitostress – OCR basal e respiração máxima; (C) expressão de citocinas avaliada por citometria de fluxo. Resultados

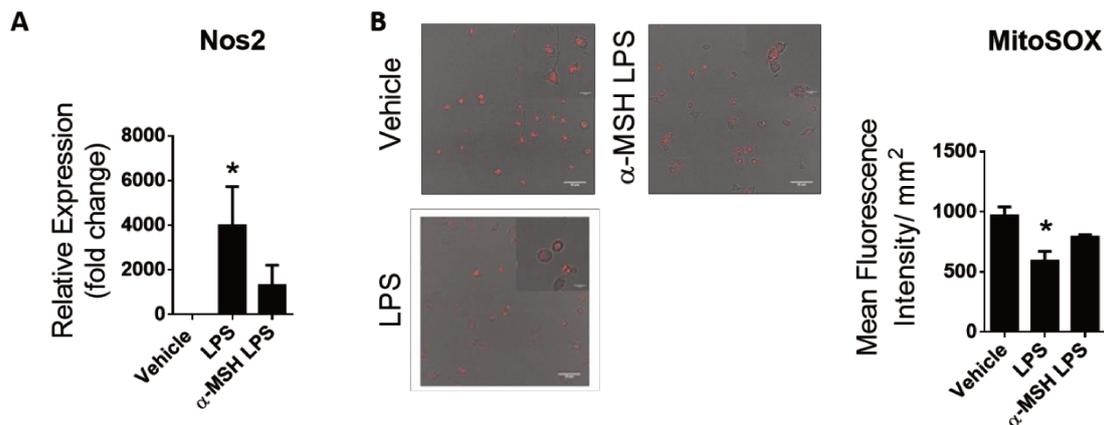


apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $<0,05$ . N= 3-5 One way Anova.

**Figura 5:  $\alpha$ -MSH não promove alterações no conteúdo e ultraestrutura mitocondrias da micróglia.** Avaliação do conteúdo mitocondrial e morfológico mitocondrial de micróglia nos tratamentos propostos. Avaliação do conteúdo mitocondrial indiretamente através da expressão da enzima citocromo c oxidase através de microscopia confocal e da morfologia mitocondrial através de microscopia eletrônica de transmissão. (A) Expressão proteica de COXIV. (B) Microscopia eletrônica representativa de organelas/mitocôndria na micróglia em células tratadas

conforme descrição. Barra de escala de 500 nM. Resultados apresentados como média +/- SEM. \* <0,05. N= 3-5 One way Anova.

Também observamos que o tratamento com  $\alpha$ -MSH reduziu a expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2/iNos) induzida por LPS em células murinas (Figura 6A). A iNOS é uma enzima chave na aquisição do perfil pró-inflamatório por macrófagos, com participação fundamental na reprogramação metabólica [60]. Uma vez que a atividade de iNOS está relacionada com o balanço REDOX da célula, investigamos a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mROS) em células murinas (Figura 6B). O tratamento com LPS reduz a produção de mROS, mas a adição de  $\alpha$ -MSH reverte a redução de mROS causada pelo tratamento com LPS. Esses dados indicam que o  $\alpha$ -MSH não leva a alterações no metabolismo mitocondrial em células murinas. O bloqueio da fosforilação oxidativa não impacta a produção de citocinas em células co-tratadas com  $\alpha$ -MSH e LPS, indicando que a reprogramação metabólica que essas células sofrem estão centradas na glicólise. Os dados de mROS dão indícios de que o  $\alpha$ -MSH pode levar a alterações no estado REDOX mitocondrial, mas os impactos de tal modulação ainda não são claros. Desta forma, é possível concluir que o tratamento com  $\alpha$ -MSH não promove imunorregulação através de modulações mitocondriais.



**Figura 6: O neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH promove alterações no estado REDOX da micróglia.** Avaliação da expressão de Nos2 em micróglia ativada conforme descrito e avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais através de probe comercial MitoSOX. (A) Expressão gênica de NOS2; (B) Intensidade da fluorescência da probe MitoSox. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $<0,05$ . N= 3-5 One way Anova.

#### 5.4 $\alpha$ -MSH reduz a inflamação hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica

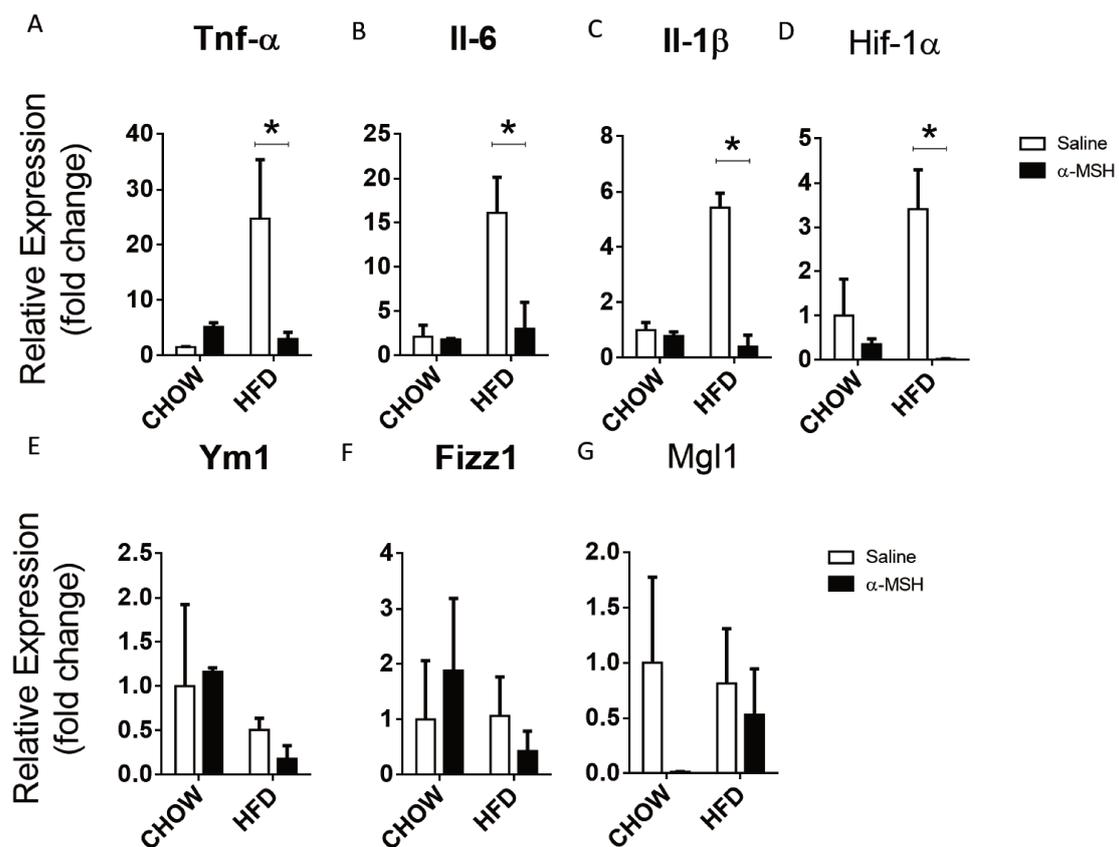
A obesidade induzida por dieta (DIO) leva à instalação de um processo neuroinflamatório no hipotálamo de roedores e humanos [35-37], que precede as demais alterações na arquitetura hipotalâmica na obesidade [36]. A rápida indução deste processo sugere que a neuroinflamação ativamente participa das alterações patofisiológicas associadas com o excesso de aporte calórico.

A fim de determinar o impacto do tratamento com  $\alpha$ -MSH na inflamação hipotalâmica na DIO, animais alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica por quatro semanas (HFD) foram submetidos à injeção intracerebroventricular de  $\alpha$ -MSH ou veículo e a expressão gênica de citocinas e mediadores inflamatórios foi avaliada (Figura 7).

Nossos dados revelam que uma injeção única de  $\alpha$ -MSH reduz a expressão gênica de citocinas inflamatórias (Figura 7 A-C) e do fator de transcrição HIF-

1 $\alpha$  (Figura 7D), mas sem alterar a expressão de marcadores de macrófagos M2 (Figura 6E-G). Tais dados condizem com os achados na cultura celular, em que o tratamento com o neuropeptídeo leva à diminuição da expressão de mediadores inflamatórios. É importante ressaltar que as demais células do microambiente hipotalâmico são responsivas ao neuropeptídeo [108] podendo haver contribuição de múltiplas células, como os astrócitos, para tal fenótipo.

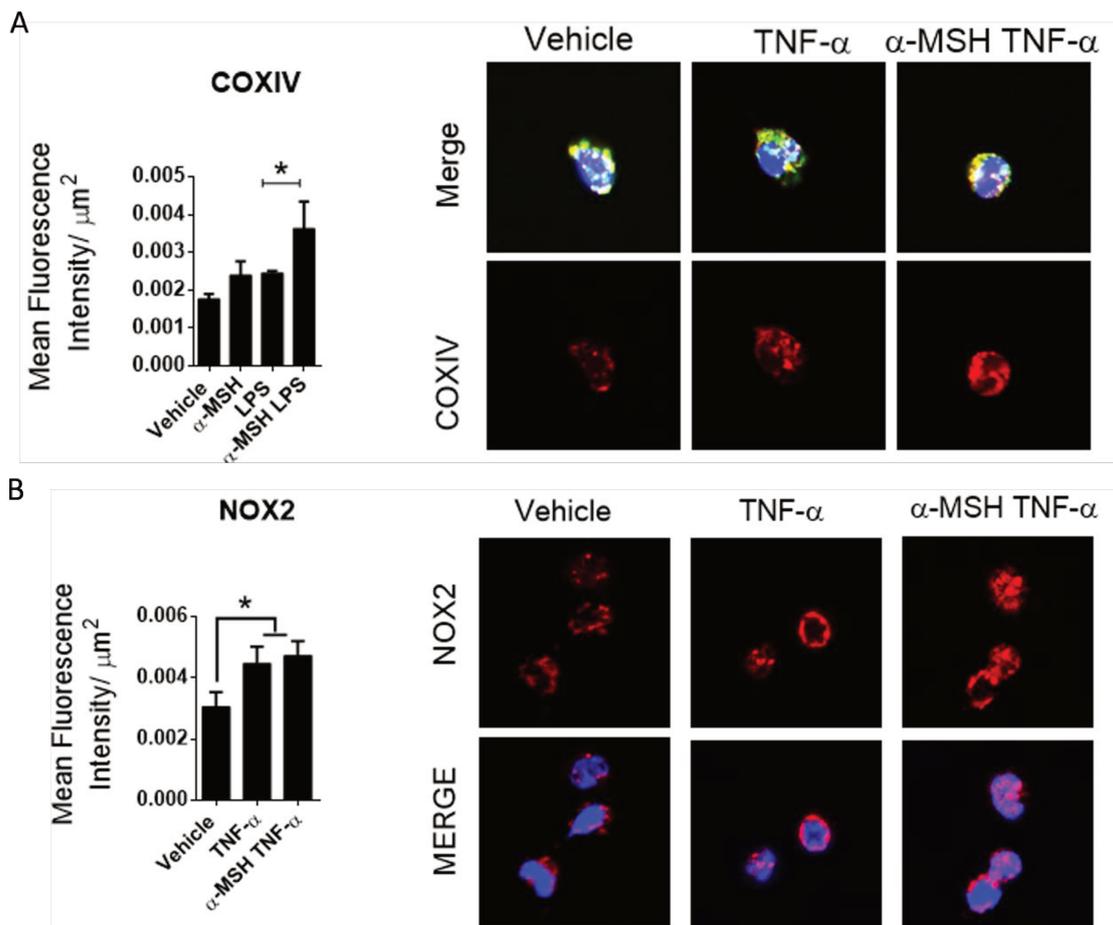
Nossos dados, até então, nos levam a crer que o uso de melanocortinas apresenta potencial terapêutico à obesidade nos estágios iniciais através da diminuição do processo inflamatório.



**Figura 7:  $\alpha$ -MSH atenua inflamação hipotalâmica induzida por dieta hiperlipídica**  
Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios após injeção aguda de  $\alpha$ -MSH em animais alimentados por quatro semanas em dieta padrão ou dieta hiperlipídica. A expressão gênica de citocinas e HIF-1  $\alpha$  (A-D) e de marcadores de macrófagos M2 (E-G) foi avaliada 6 horas após a injeção estereotáxica do neuropeptídeo. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM.  $n=3-5$  \* $<0,05$ . One way Anova.

### **5.5 Micróglia de humanos é responsiva ao tratamento com $\alpha$ -MSH**

Humanos obesos apresentam disfunção do sistema melanocortinérgico [109-111]. Investigamos se a micróglia humana era responsiva ao tratamento com  $\alpha$ -MSH. O tratamento com TNF- $\alpha$  foi escolhido como estímulo inflamatório, pois tais células não são responsivas a LPS [112]. Uma vez que macrófagos humanos não dependem de glicólise para a montagem da resposta inflamatória [113], analisamos parâmetros mitocondriais das células obtidas e submetidas aos tratamentos. A expressão de COXIV não foi alterada frente aos estímulos com  $\alpha$ -MSH ou TNF- $\alpha$  sozinhos, mas células co-tratadas apresentam uma maior expressão deste fator (Figura 8A). Em seguida, investigamos a expressão da enzima NADPH oxidase 2 (NOX2) em micróglia primária de humanos. A atividade de NOX2 leva ao aumento de intermediários oxidativos, com envolvimento da modulação de vias metabólicas [50, 114-116]. O tratamento com TNF- $\alpha$  elevou a expressão de NOX2, o que não foi revertido com o tratamento com  $\alpha$ -MSH (Figura 8B). A partir deste dado podemos concluir que as células da micróglia humana são responsivas ao  $\alpha$ -MSH, ao menos quando ativadas. É possível concluir também que o tratamento com  $\alpha$ -MSH leva a mudanças imunometabólicas dependentes do metabolismo mitocondrial, diferentemente do que ocorre com células murinas.



**Figura 8: A micróglia humana é responsiva ao  $\alpha$ -MSH.** Avaliação de marcadores mitocondriais em células da micróglia obtidas a partir de tecido proveniente de autópsia. As células foram isoladas do tecido, plaqueadas e estimuladas com veículo,  $\text{TNF-}\alpha$  (100 nM) ou  $\alpha$ -MSH (1 $\mu\text{M}$ ) +  $\text{TNF-}\alpha$  e avaliadas após 4 horas de estímulo. A expressão proteica de (A) COXIV e (B) NOX2 foi avaliada através de microscopia confocal. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $<0,05$ .  $n=3$  One way Anova.

## 6. Discussão

A obesidade é uma doença que atingiu níveis epidemiológicos [1,2]. O hipotálamo é um dos principais centros reguladores da homeostase energética, sendo afetado de maneira estrutural e funcional na obesidade e/ou doenças metabólicas [34-36].

Ratificando nossa hipótese de que o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH apresenta ação anti-inflamatória e de que a diminuição de seus níveis teciduais contribuam para a inflamação orexigênica, nossos dados indicam que o tratamento com  $\alpha$ -MSH diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS em células primárias de micróglia. Observamos redução significativa na secreção de TNF e IL-6, ambas componentes da resposta inflamatória hipotalâmica durante a obesidade [117, 118]. Investigamos através de qual receptor o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH apresenta efeitos anti-inflamatórios e observamos que o MC3R é modulado positivamente frente a estímulos inflamatórios e sua inibição reverte os efeitos na secreção de citocinas promovida pelo tratamento com o neuropeptídeo. O MC3R é o receptor pelo qual o  $\alpha$ -MSH atua em macrófagos periféricos também [51-56]. Tais dados reforçam nossa hipótese de que o  $\alpha$ -MSH é um potencial imunoregulador no hipotálamo, afetando diretamente a produção de mediadores inflamatórios.

Nossos dados ainda indicam que o tratamento com o neuropeptídeo promoveu a atividade fagocítica da micróglia, uma característica típica de células reguladoras (107) e de extrema importância para o funcionamento homeostático do SNC (40-42).

A efetuação da resposta imune está intimamente associada com a reprogramação metabólica de células imunes [62,79]. De maneira simplificada, micróglia M1 apresentam dependência da via glicolítica como fonte de ATP e micróglia polarizada para M2 apresentam indução e dependência do metabolismo mitocondrial [73-80]. Desta maneira, exploramos se o tratamento com o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH atuava na micróglia através de modulações imunometabólicas. Uma vez que observamos a atenuação da resposta

induzida por LPS, investigamos o perfil glicolítico da micróglia frente ao tratamento com o neuropeptídeo. O tratamento com o neuropeptídeo reduz a glicólise induzida por LPS, evidenciada por menor concentração extracelular de lactato e ensaios de metabolismo em tempo real. O tratamento com  $\alpha$ -MSH levou ao mesmo padrão de expressão de citocinas que uma abordagem glucoprivativas. Dessa maneira é possível determinar que os efeitos imunoreguladores do  $\alpha$ -MSH são dependentes de alteração no metabolismo celular, e centradas na redução da glicólise.

O aumento da função mitocondrial é característico de células imunes com fenótipo anti-inflamatório [73-80]. A inibição da expressão/secreção de citocinas pró-inflamatórias combinada com a redução da glicólise nas células co-tratadas com o  $\alpha$ -MSH e LPS nos levou a investigar se o metabolismo mitocondrial é modulado frente aos tratamentos propostos. Nossos dados indicam não haver modulação do metabolismo mitocondrial em nenhum dos grupos tratados. Foram avaliados potencial de membrana mitocondrial, ensaios de metabolismo em tempo real e padrão de expressão de citocinas das células frente ao tratamento com inibidor químico da oxidação fosforilativa. A nível estrutural, a mitocôndria de células ativadas com LPS apresentam mitocôndrias fusiformes e com cristas pouco definidas, evidenciando dano funcional; células co-tratadas com o neuropeptídeo e LPS não apresentam diferença entre si. Em conjunto, tais dados demonstram que a modulação metabólica associada ao tratamento com o neuropeptídeo são independentes da funcionalidade mitocondrial. Esse resultado sugere que o  $\alpha$ -MSH atua como atenuador do processo pró-inflamatório, sem necessariamente induzir um fenótipo anti-inflamatório clássico.

A fim de explorar a relevância fisiológica dos nossos dados obtidos em cultura primária de micróglia, optamos por utilizar camundongos alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica, como modelo de inflamação hipotalâmica. Ambos os grupos foram submetidos a injeção aguda, através de cirurgia estereotáxica, do neuropeptídeo, segundo doses estabelecidas na literatura [119]. Os achados são coerentes com os dados de cultura celular: existe redução da expressão de citocinas inflamatórias no tecido hipotalâmico, desacoplado da indução de expressão de marcadores típicos de células M2. Dessa maneira, sugerimos que o neuropeptídeo apresenta papel na homeostase tecidual, além da clássica função anorexigênica, atenuando possíveis sinais inflamatórios que eventualmente chegam ao hipotálamo, como nutrientes [120] ou leptina [121]. Vale ressaltar que as demais células do microambiente hipotalâmico são resposnivas ao neuropetídeo [108], e podem contribuir com o fenótipo. Porém nossos dados em cultura celular apresentam um padrão similar, sugerindo uma participação da sinalização de  $\alpha$ -MSH na micróglia promovendo a atenuação da inflamação hipotalâmica.

Por fim, tivemos a oportunidade de explorar a responsividade de micróglia humana ao tratamento com o  $\alpha$ -MSH. Nossos dados demonstram que tais células são responsivas ao neuropeptídeo, observamos que as modulações imunometabólicas envolvidas nesta regulação são distintas entre o modelo murino e humano; condizendo com dados da literatura. Tal dado dá uma perspectiva translacional ao nosso estudo. Humanos apresentam disfunção do sistema de melanocortinas concomitante à ativação da micróglia no hipotálamo em condições obesogênicas [109-111]. Entretanto, os mecanismos imunoregulatórios que governam macrófagos em humanos e no modelo murino

são diferentes [113]. É importante ressaltar também que as células de humanos foram ativadas com TNF, uma vez que as células humanas não são responsivas ao LPS [112]. Portanto é possível que as diferenças de regulação imunometabólicas encontradas entre as duas espécies estejam relacionadas a cascatas de sinalizações distintas que ambos sinais – TNF e LPS – ativam nas células. Não tivemos a oportunidade de explorar de maneira mais profunda o impacto do neuropeptídeo na função efetora de micróglia humana, portanto mais estudos são necessários a fim de se determinar o potencial terapêutico do  $\alpha$ -MSH em células humanas.

Desta forma, exploramos o papel do neuropeptídeo como imunoregulador e estabelecemos que tais modulações ocorrem em um mecanismo imunometabólico. Também foi estabelecido um link translacional para o estudo, que precisa ser melhor explorado.

## **7. Conclusão**

Pudemos estabelecer indícios de efeitos imunoreguladores em micróglia humana. Portanto, o neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH inibe a ativação da micróglia, e, conseqüentemente, tem promove redução da inflamação hipotalâmica induzida por obesidade induzida por dieta.

## 8.Referências Bibliográficas

1. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-209.
2. Guh, D.P., et al., *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2009. **9**: p. 88.
3. Ogden, C.L., et al., *Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008*. JAMA, 2010. **303**(3): p. 242-9.
4. Kennedy, G.C., *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1953. **140**(901): p. 578-96.
5. Gibbs, J., R.C. Young, and G.P. Smith, *Cholecystokinin decreases food intake in rats*. 1973. *Obes Res*, 1997. **5**(3): p. 284-90.
6. Woods, S.C., et al., *Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons*. Nature, 1979. **282**(5738): p. 503-5.
7. Baura, G.D., et al., *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1824-30.
8. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
9. Sipols, A.J., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression*. Diabetes, 1995. **44**(2): p. 147-51.
10. Schwartz, M.W., et al., *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 589-93.
11. Cheung, C.C., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4489-92.
12. Baskin, D.G., J.F. Breininger, and M.W. Schwartz, *Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 828-33.
13. Carvalheira, J.B., et al., *Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus*. *Obes Res*, 2005. **13**(1): p. 48-57.
14. Bouret, S.G., S.J. Draper, and R.B. Simerly, *Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding*. Science, 2004. **304**(5667): p. 108-10.
15. Xu, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor*. Nat Neurosci, 2003. **6**(7): p. 736-42.
16. Jobst, E.E., P.J. Enriori, and M.A. Cowley, *The electrophysiology of feeding circuits*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(10): p. 488-99.
17. Cone, R.D., *Anatomy and regulation of the central melanocortin system*. Nat Neurosci, 2005. **8**(5): p. 571-8.
18. Drouin, J., et al., *Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids*. Genome, 1989. **31**(2): p. 510-9.

19. de Souza, F.S., et al., *Identification of neuronal enhancers of the proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3076-86.
20. Allen, R.G., J.M. Hatfield, and J. Stack, *Post-translational processing of pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides during fetal monkey pituitary development. I. Adrenocorticotropin (ACTH) and alpha-melanotropins (alpha-MSHs)*. Dev Biol, 1988. **126**(1): p. 156-63.
21. Evans, V.R., et al., *Alpha-melanocyte-stimulating hormone and N-acetyl-beta-endorphin immunoreactivities are localized in the human pituitary but are not restricted to the zona intermedia*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 97-106.
22. Millington, G.W., et al., *Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat*. Neuroscience, 2001. **108**(3): p. 437-45.
23. Bouret, S.G., S.J. Draper, and R.B. Simerly, *Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice*. J Neurosci, 2004. **24**(11): p. 2797-805.
24. Krashes, M.J., et al., *An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger*. Nature, 2014. **507**(7491): p. 238-42.
25. Clark, J.T., et al., *Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats*. Endocrinology, 1984. **115**(1): p. 427-9.
26. Stanley, B.G., A.S. Chin, and S.F. Leibowitz, *Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action*. Brain Res Bull, 1985. **14**(6): p. 521-4.
27. Broberger, C., et al., *Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems*. J Comp Neurol, 1998. **402**(4): p. 460-74.
28. Broberger, C., et al., *The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15043-8.
29. Baker, R.A. and M. Herkenham, *Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat*. J Comp Neurol, 1995. **358**(4): p. 518-30.
30. Bagnol, D., et al., *Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain*. J Neurosci, 1999. **19**(18): p. RC26.
31. Kim, M.S., et al., *Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 177-82.
32. Bewick, G.A., et al., *Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype*. FASEB J, 2005. **19**(12): p. 1680-2.
33. Wu, Q., M.P. Boyle, and R.D. Palmiter, *Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1225-34.

34. Milanski, M., et al., *Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 359-70.
35. Moraes, J.C., et al., *High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5045.
36. Souza, G.F., et al., *Defective regulation of POMC precedes hypothalamic inflammation in diet-induced obesity*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29290.
37. Moraes-Vieira, P.M., et al., *Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: leading actor or just a coadjuvant?* Obes Rev, 2012. **13**(8): p. 733-43.
38. Gomez Perdiguero, E., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 547-51.
39. Frost, J.L. and D.P. Schafer, *Microglia: Architects of the Developing Nervous System*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(8): p. 587-597.
40. Peri, F. and C. Nusslein-Volhard, *Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo*. Cell, 2008. **133**(5): p. 916-27.
41. Mazaheri, F., et al., *Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4046.
42. Ashwell, K., *Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum*. Brain Res Dev Brain Res, 1990. **55**(2): p. 219-30.
43. Sedel, F., et al., *Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death*. J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2236-46.
44. Sierra, A., et al., *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 483-95.
45. Hibbs, J.B., Jr., et al., *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 87-94.
46. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
47. Mills, C.D., *Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue*. Crit Rev Immunol, 2001. **21**(5): p. 399-425.
48. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
49. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
50. Thaler, J.P., et al., *Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 153-62.
51. Carniglia, L., et al., *[Nle4, D-Phe7]-alpha-MSH Inhibits Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Induced Microglial Activation and Promotes a M2-Like Phenotype*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158564.
52. Catania, A., et al., *The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro*. Peptides, 1996. **17**(4): p. 675-9.

53. Lam, C.W., M. Perretti, and S.J. Getting, *Melanocortin receptor signaling in RAW264.7 macrophage cell line*. *Peptides*, 2006. **27**(2): p. 404-12.
54. Capsoni, F., et al., *Melanocortin peptides inhibit urate crystal-induced activation of phagocytic cells*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(5): p. R151.
55. Mountjoy, K.G., et al., *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors*. *Science*, 1992. **257**(5074): p. 1248-51.
56. Lu, D., et al., *Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor*. *Nature*, 1994. **371**(6500): p. 799-802.
57. Caruso, V., et al., *Synaptic changes induced by melanocortin signalling*. *Nat Rev Neurosci*, 2014. **15**(2): p. 98-110.
58. Jha, A.K., et al., *Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization*. *Immunity*, 2015. **42**(3): p. 419-30.
59. Michelucci, A., et al., *Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(19): p. 7820-5.
60. MacMicking, J.D., et al., *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(10): p. 5243-8.
61. Mills, E.L., et al., *Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages*. *Cell*, 2016. **167**(2): p. 457-470 e13.
62. Tannahill, G.M., et al., *Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha*. *Nature*, 2013. **496**(7444): p. 238-42.
63. Littlewood-Evans, A., et al., *GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis*. *J Exp Med*, 2016. **213**(9): p. 1655-62.
64. Jose, C., N. Bellance, and R. Rossignol, *Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?* *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(6): p. 552-61.
65. Weiss, G. and U.E. Schaible, *Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria*. *Immunol Rev*, 2015. **264**(1): p. 182-203.
66. Cyster, J.G., et al., *25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(11): p. 731-43.
67. Semba, H., et al., *HIF-1alpha-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11635.
68. Xie, M., et al., *PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13280.
69. Jiang, H., et al., *PFKFB3-Driven Macrophage Glycolytic Metabolism Is a Crucial Component of Innate Antiviral Defense*. *J Immunol*, 2016. **197**(7): p. 2880-90.
70. Millet, P., et al., *GAPDH Binding to TNF-alpha mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism*. *J Immunol*, 2016. **196**(6): p. 2541-51.

71. Lu, B., et al., *Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 670-4.
72. Infantino, V., et al., *The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation*. Biochem J, 2011. **438**(3): p. 433-6.
73. Van den Bossche, J., et al., *Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages*. Cell Rep, 2016. **17**(3): p. 684-696.
74. Covarrubias, A.J., et al., *Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation*. Elife, 2016. **5**.
75. Tan, Z., et al., *Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism*. J Immunol, 2015. **194**(12): p. 6082-9.
76. Nomura, M., et al., *Fatty acid oxidation in macrophage polarization*. Nat Immunol, 2016. **17**(3): p. 216-7.
77. Namgaladze, D. and B. Brune, *Fatty acid oxidation is dispensable for human macrophage IL-4-induced polarization*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(9): p. 1329-35.
78. Johnson, A.R., et al., *Metabolic reprogramming through fatty acid transport protein 1 (FATP1) regulates macrophage inflammatory potential and adipose inflammation*. Mol Metab, 2016. **5**(7): p. 506-526.
79. Ip, W.K.E., et al., *Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages*. Science, 2017. **356**(6337): p. 513-519.
80. Correa da Silva, F., et al., *Ghrelin effects on mitochondrial fitness modulates macrophage function*. Free Radic Biol Med, 2019. **145**: p. 61-66.
81. Grabert, K., et al., *Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging*. Nat Neurosci, 2016. **19**(3): p. 504-16.
82. De Biase, L.M., et al., *Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia*. Neuron, 2017. **95**(2): p. 341-356 e6.
83. Hammond, T.R., et al., *Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes*. Immunity, 2019. **50**(1): p. 253-271 e6.
84. Voloboueva, L.A., et al., *Inflammatory response of microglial BV-2 cells includes a glycolytic shift and is modulated by mitochondrial glucose-regulated protein 75/mortalin*. FEBS Lett, 2013. **587**(6): p. 756-62.
85. Gimeno-Bayon, J., et al., *Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype*. J Neurosci Res, 2014. **92**(6): p. 723-31.
86. Orihuela, R., C.A. McPherson, and G.J. Harry, *Microglial M1/M2 polarization and metabolic states*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(4): p. 649-65.
87. Nagy, A.M., et al., *Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018. **1859**(3): p. 201-214.
88. He, Y., et al., *RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 153.

89. Russell, D.G., L. Huang, and B.C. VanderVen, *Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(5): p. 291-304.
90. Getting, S.J., et al., *POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation*. *J Immunol*, 1999. **162**(12): p. 7446-53.
91. Getting, S.J., et al., *[D-Trp8]-gamma-melanocyte-stimulating hormone exhibits anti-inflammatory efficacy in mice bearing a nonfunctional MC1R (recessive yellow e/e mouse)*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(6): p. 1850-5.
92. Getting, S.J., et al., *Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 3323-30.
93. Hruby, V.J., et al., *Cyclic lactam alpha-melanotropin analogues of Ac-Nle4-cyclo[Asp5, D-Phe7,Lys10] alpha-melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH2 with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors*. *J Med Chem*, 1995. **38**(18): p. 3454-61.
94. Grieco, P., et al., *Further structure-activity studies of lactam derivatives of MT-II and SHU-9119: their activity and selectivity at human melanocortin receptors 3, 4, and 5*. *Peptides*, 2007. **28**(6): p. 1191-6.
95. Nogueiras, R., et al., *The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3475-88.
96. Valdearcos, M., et al., *Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility*. *Cell Metab*, 2017. **26**(1): p. 185-197 e3.
97. Mackman, N., K. Brand, and T.S. Edgington, *Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites*. *J Exp Med*, 1991. **174**(6): p. 1517-26.
98. Schanke, J.T., et al., *An AP1 binding site upstream of the kappa immunoglobulin intron enhancer binds inducible factors and contributes to expression*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(24): p. 5425-32.
99. Shin, H.S., et al., *Definition of a lipopolysaccharide-responsive element in the 5'-flanking regions of MuRantes and crg-2*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(5): p. 2914-25.
100. Bruce-Keller, A.J., et al., *Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation*. *Endocrinology*, 2000. **141**(10): p. 3646-56.
101. Blacker, T.S., et al., *Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3936.
102. Huang, S.C., et al., *Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(9): p. 846-55.
103. Huang, S.C., et al., *Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation*. *Immunity*, 2016. **45**(4): p. 817-830.

104. Van den Bossche, J., J. Baardman, and M.P. de Winther, *Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis*. J Vis Exp, 2015(105).
105. Van den Bossche, J., et al., *Pivotal Advance: Arginase-1-independent polyamine production stimulates the expression of IL-4-induced alternatively activated macrophage markers while inhibiting LPS-induced expression of inflammatory genes*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(5): p. 685-99.
106. Vats, D., et al., *Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation*. Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 13-24.
107. Divakaruni, A.S., et al., *Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis*. Cell Metab, 2018. **28**(3): p. 490-503 e7.
108. Kishi, T., et al., *Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat*. J Comp Neurol, 2003. **457**(3): p. 213-35.
109. Bochukova, E.G., et al., *A Transcriptomic Signature of the Hypothalamic Response to Fasting and BDNF Deficiency in Prader-Willi Syndrome*. Cell Rep, 2018. **22**(13): p. 3401-3408.
110. Kumar, R.B. and L.J. Aronne, *Hypothalamic Inflammation: Is There Evidence for Human Obesity?* Curr Obes Rep, 2014. **3**(2): p. 242-7.
111. Kreutzer, C., et al., *Hypothalamic Inflammation in Human Obesity Is Mediated by Environmental and Genetic Factors*. Diabetes, 2017. **66**(9): p. 2407-2415.
112. Melief, J., et al., *Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness*. Glia, 2012. **60**(10): p. 1506-17.
113. Vijayan, V., et al., *Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis*. Redox Biol, 2019. **22**: p. 101147.
114. Pizzolla, A., et al., *Reactive oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 5003-11.
115. Lee, C.H., et al., *Hypothalamic Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Obesity-Associated Hypothalamic Inflammation*. Cell Rep, 2018. **25**(4): p. 934-946 e5.
116. Dikalov, S.I., et al., *Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(2): p. 281-94.
117. Yi, C.X., et al., *TNFalpha drives mitochondrial stress in POMC neurons in obesity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15143.
118. Timper, K., et al., *IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling*. Cell Rep, 2017. **19**(2): p. 267-280.
119. Schneeberger, M., et al., *Reduced alpha-MSH Underlies Hypothalamic ER-Stress-Induced Hepatic Gluconeogenesis*. Cell Rep, 2015. **12**(3): p. 361-70.
120. Gao, Y., et al., *Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity*. Glia, 2014. **62**(1): p. 17-25.

121. Gao, Y., et al., *Deficiency of leptin receptor in myeloid cells disrupts hypothalamic metabolic circuits and causes body weight increase*. Mol Metab, 2018. **7**: p. 155-160.

## 8. Anexos

### 8.1 Declaração Bioética – Formulário CEUA



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Influência do Sintético ([Nle4, D-Phe7]- $\pm$ -MSH no Metabolismo de Micrógliã: Possíveis Implicações na Obesidade**, registrada com o nº **4814-1/2018**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira e Felipe Corrêa da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **16 de abril de 2018**.

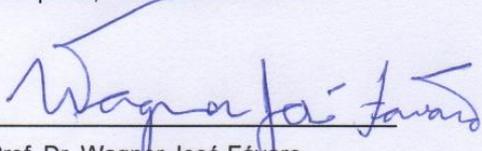
Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/04/2018-31/12/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/04/2018-31/12/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	50
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	15
Idade/Peso:	03 dias / 0g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout - B6J.B6N(Cg)-Cx3cr1tm1.1(cre)Jung
No. de animais:	30
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-COX8A/Dendra2)Dcc/J
No. de animais:	05
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout B6J.B6N(Cg)-Cx3cr1tm1.1(cre)Jung B6;129S-Gt(ROSA)2
No. de animais:	12

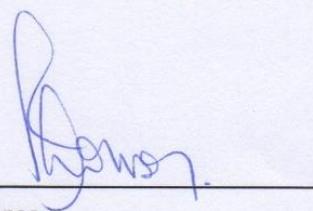


Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6;129S4-Mc4rtm1Low/J
No. de animais:	27
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.129(Cg)-Ccr2tm2.1lfc/J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.129S1-Stat3tm1Xyfu/J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.129(Cg)-Mfn2tm3Dcc/J
No. de animais:	05
Idade/Peso:	06 semanas / 20g
Sexo:	machos
Biotério onde serão mantidos os animais:	The Jackson Laboratory, USA

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 16 de abril de 2018.

  
 Prof. Dr. Wagner José Fávoro  
 Coordenador

  
 Fátima Alonso  
 Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## 8.2 Declaração referente a direitos autorais

### Declaração

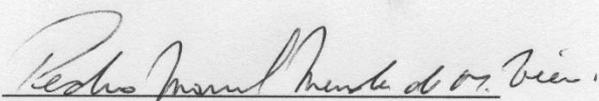
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Papel do neuropeptídeo  $\alpha$ -MSH na micróglia: possíveis implicações imunometabólicas**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de janeiro de 2020

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Felipe Corrêa da Silva**

RG n.º 52.982.134-5

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira**

RG n.º 63.747.832-0