

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Impacto da obesidade sobre células do sistema imune: instabilidade genômica, disfunção mitocondrial, imunossenescência e ativação inflamatória

Linha de Pesquisa: Biomarcadores de Inflamação e Senescência Celular

MARIANA MIGLIORINI PARISI

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Florencia María Barbé-Tuana

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Fátima Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Impacto da obesidade sobre células do sistema imune: instabilidade genômica, disfunção mitocondrial, imunossenescência e ativação inflamatória

Linha de Pesquisa: Biomarcadores de Inflamação e Senescência Celular

MARIANA MIGLIORINI PARISI

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Florencia María Barbé-Tuana

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Fátima Costa Rodrigues Guma

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Parisi, Mariana Migliorini

Impacto da obesidade sobre células do sistema imune: instabilidade genômica, disfunção mitocondrial, imunossenescência e ativação inflamatória / Mariana Migliorini Parisi. -- 2018.

145 f.

Orientador: Florencia María Barbé-Tuana.

Coorientador: Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Obesidade. 2. Sistema Imune. 3. imunossenescência. 4. dano ao DNA. 5. inflamação. I. Barbé-Tuana, Florencia María, orient. II. Guma, Fátima Teresinha Costa Rodrigues, coorient. III.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser, mas, graças a Deus, não sou o que eu era.[...]”
Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste doutorado é o final de uma longa caminhada, a qual eu não conseguia ter realizado sem a presença e o apoio de muitas pessoas. Desta forma, eu agradeço:

- Minha orientadora Dra. Florencia María Barbé-Tuana, por ter sido muitas vezes uma grande amiga, algumas vezes um pouco minha mãe, todas as vezes uma líder extraordinária. És meu grande exemplo de pesquisadora e ser humano. Obrigada por sempre ter me apoiado, principalmente quando decidi seguir a carreira de docente juntamente com o doutorado. Obrigada por ter me mostrado como a imunologia e a citometria de fluxo são apaixonantes, por ter me mostrado a importância da ética e do senso crítico na pesquisa, por ter me mostrado a importância do trabalho em grupo e da coletividade. Meu maior desejo é um dia ser uma orientadora como você. Minha eterna gratidão por tudo.

- Minha co-orientadora Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma, a quem eu devo a oportunidade de fazer parte da grande família que é o laboratório 21. Obrigada por me abrir as portas do teu laboratório, por acreditar no meu potencial, por apoiar minha escolha de assumir um emprego juntamente com o doutorado, por dar todo apoio necessário a execução deste trabalho. Obrigada por permitir que tudo isso acontecesse.

- Aos meus pais, Airton e Maria de Lourdes, que são os grandes responsáveis pela pessoa que sou. Sem o apoio e amor de meus pais nunca teria tido coragem de sair de casa para buscar meu grande sonho: fazer doutorado. Obrigada por cada oportunidade, por cada conselho, por cada puxão de orelha e por cada gesto de carinho e amor. Obrigada também pelo apoio financeiro todas as vezes que a bolsa de

doutorado ficou “curta”. Obrigada por sempre me acharem “o máximo” e confiarem em mim, mesmo quando eu dizia que estava tudo dando errado.

- As minhas irmãs, Jordana e Vitória, por serem porto seguro e amor para toda hora. Por acreditarem que eu sou um bom exemplo como irmã mais velha. Obrigada Jordana por me esperar com a cama quentinha em Porto Alegre toda vez que eu chegava ‘congelada” de Cruz Alta.

- Ao meu companheiro Fabio, que chegou já na metade do doutorado, mas que tem sido meu maior alicerce neste último ano. Obrigada por apoiar minhas escolhas, por todas caronas até a rodoviária de Cruz Alta, por me esperar com a cama quentinha em Cruz Alta quando eu chegava “congelada’ de Porto Alegre. Obrigada por fazer a contagem regressiva de quantas viagens Porto Alegre-Cruz Alta faltavam para acabar o doutorado e, assim, acalmar meus ânimos quando eu já estava exausta. Obrigada por me fazer sentir tão amada.

- Aos meus colegas do grupo de ‘Biomarcadores de Inflamação e Senescência Celular” Lucas Grun, Patrícia Lavandoski e Vinicius Pierdoná. Sem vocês este trabalho não teria sido possível. Obrigada pela parceria incondicional, tanto nos experimentos deste doutorado como nas caipirinhas no Imperial. Ao lado de vocês tudo é mais leve, mais fácil e mais feliz. Vocês são incríveis e estarão sempre no meu coração. Minha eterna gratidão.

- Aos meus colegas do laboratório 21, grandes parceiros e amigos nesta jornada. Obrigada pelos dias de riso fácil e pelos dia de riso não tão fácil assim. Cada chimarrão entre cada experimento fez meu doutorado mais leve. Obrigada pelas discussões científicas, pelos papos de nerd e pelos papos ‘sem noção’ também. Levo cada um no meu coração.

- A Gabriela Hirsch e a Priscila Machado, grandes amigas que fiz no laboratório 21 desde o mestrado, que sempre foram companheiras para todas as horas e aquelas que ouviram, muitas vezes, meus lamentos de experimentos que não deram certo.
- A Cassiana Siebert por dividir a casa e a vida nestes últimos anos de mestrado e doutorado. Obrigada por dividir os sonhos e as angústias comigo. E por ser a síndica resolve tudo da nossa casa.
- Aos professores Alexandre Vontobel Padoin e José Cláudio Mottin pela parceria neste trabalho e recrutamento dos pacientes no Centro de Obesidade Mórbida e Síndrome Metabólica (COM) da PUCRS. A Rejane, funcionária do COM, pela ajuda na organização dos pacientes e coletas.
- Ao professor Fabio Klamt e sua aluna Ivi Juliana Bristot pelas análises de respirometria mitocondrial de alta resolução.
- Ao professor José Claudio Moreira Fonseca e sua aluna Helen da Rosa pelo ensaio do cometa e de micronúcleos.
- Aos indivíduos participantes desta pesquisa pela disponibilidade.
- Aos professores do Departamento de Bioquímica pelo conhecimento repassado nas disciplinas.
- Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pelos auxílios prestados.
- A UFRGS e ao Departamento de Bioquímica pela formação de qualidade.
- A CNPQ e a CAPES pela bolsa de estudo e financiamento deste projeto.

APRESENTAÇÃO

PARTE I

Resumo e *Abstract*

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Introdução

Objetivos

PARTE II

Capítulo I: Artigo 1 – *Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation* (manuscrito publicado)

Capítulo II - Plasma de indivíduos portadores de obesidade ativa os macrófagos

Capítulo III – Instabilidade genômica e inflamação em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade

PARTE III

Discussão

Conclusão

Perspectivas

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas na introdução e na discussão.

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS

Prêmios oriundos da presente tese de doutorado

Artigos publicados como coautora durante o doutoramento

Trabalhos apresentados em congressos durante o doutoramento

SUMÁRIO

PARTE I.....	- 1 -
I.1 RESUMO.....	- 2 -
I.2 ABSTRACT.....	- 3 -
I.3 LISTA DE ABREVIATURAS*.....	- 4 -
I.4 LISTA DE TABELAS.....	- 8 -
I.5 LISTA DE FIGURAS.....	- 9 -
I.6 INTRODUÇÃO.....	12
I.6.1 Instabilidade genômica e sinalização da histona 2AFX (H2AFX).....	13
I.6.2 Senescência celular.....	18
I.6.2.1 Imunossenescência.....	22
I.6.3 Disfunção mitocondrial.....	26
I.6.4 Alterações na comunicação celular: Inflamm-aging e SASP.....	29
I.6.7 Obesidade como modelo de imunossenescência prematura.....	31
I.7 OBJETIVOS.....	35
I.7.1 Objetivo Geral.....	35
I.7.2 Objetivos específicos.....	35
PARTE II.....	36
II.1 Artigo “Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation”.....	37
II.2 Plasma de indivíduos portadores de obesidade ativa macrófagos.....	47
II.2.1 Justificativa.....	47
II.2.2 Materiais e métodos.....	48
II.2.3 Resultados.....	57

II.2.4 Conclusões parciais	67
II.3 Instabilidade genômica e inflamação em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade.....	68
II.3.1 Justificativa	68
II.3.2 Materiais e Métodos	68
II.3.3 Resultados	74
II.3.4 Conclusões parciais	86
PARTE III	87
III.1 DISCUSSÃO.....	88
III.2 CONCLUSÕES	110
III.3 PERSPECTIVAS.....	111
REFERÊNCIAS.....	112
ANEXOS	122

PARTE I

I.1 RESUMO

A imunossenescência é caracterizada pelo declínio funcional do sistema imune. Envolve mudanças fenotípicas que se traduzem em alterações sistêmicas, tendo importante impacto na sua funcionalidade. A imunossenescência tem sido associada a evolução e desfecho clínico de muitas doenças associadas ao envelhecimento prematuro, como a obesidade. A obesidade é uma condição patológica associada a expansão do tecido adiposo e a uma inflamação crônica de baixo grau que exerce efeitos negativos em múltiplos tecidos. Evidências de senescência celular, como atividade da enzima beta galactosidase (β -gal) aumentada, presença de fenótipo secretor associado a senescência e a expressão aumentada da proteína supressora de tumor TP53 (p53) e CDKN1A (p21) tem sido descritas no tecido adiposo de indivíduos portadores de obesidade. No entanto, é pouco explorado na literatura como esta inflamação sistêmica pode impactar no possível envelhecimento prematuro do sistema imune em indivíduos portadores de obesidade. Assim, o objetivo desta tese foi avaliar alterações associadas a imunossenescência prematura em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) expostas ao ambiente pró-inflamatório próprio da obesidade. Para isto, foram utilizadas três abordagens experimentais: (1) análise de parâmetros associados a imunossenescência prematura em PBMC saudáveis incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade; (2) análise de parâmetros de imunossenescência em macrófagos diferenciados a partir da linhagem celular U-937 e incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades ou com síndrome metabólica e (3) validação dos parâmetros de imunossenescência em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. Nossos resultados mostraram que o plasma de indivíduos portadores de obesidade é capaz de modular o fenótipo de PBMC previamente saudáveis, induzindo aumento na morte celular por apoptose, sinalização comprometida de H2AFX e TP53, disfunção mitocondrial basal e associada a produção de ATP, aumento de linfócitos senescentes T auxiliares CD4⁺CD28⁻ e citotóxicos CD8⁺CD28⁻, secreção de citocinas inflamatórias e ativação de monócitos e macrófagos. Além disso, o plasma de indivíduos portadores de obesidade, independente da presença de comorbidades, induziu aumento da atividade da enzima β -gal associada com a diminuição da viabilidade de macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica. Parte destes dados foram confirmados em PBMC de indivíduos portadores de obesidade, mostrando aumento da taxa de morte celular por apoptose, instabilidade genômica através de uma cinética de reparo de dano ao DNA comprometida, menor sinalização de H2AFX e aumento na frequência de micronúcleos e cariólise. Ainda, foi confirmada a redução da sinalização da via TP53/CDKN2A (p53/p16) e de ERK1/2 e o aumento na secreção de citocinas inflamatórias. Juntos, nossos dados confirmam a hipótese da obesidade como uma patologia associada a imunossenescência prematura e instabilidade genômica.

Palavras-chaves: Dano ao DNA, H2AFX, imunossenescência, inflamação, mitocôndria, macrófagos, obesidade, sistema imune.

I.2 ABSTRACT

Immunosenescence is characterized by the functional decline of the immune system. It involves phenotypic changes that translate into systemic modifications, having an important impact on its functionality. Immunosenescence has been associated with evolution and clinical outcome of many diseases associated with premature aging, such as obesity. Obesity is a pathological condition associated with the expansion of adipose tissue and chronic low-grade inflammation that exerts its negative effects on multiple tissues. Evidence of cell senescence, such as increased beta-galactosidase (β -gal) enzyme's activity, presence of the secretory phenotype associated with senescence, and increased expression of the tumor suppressor proteins TP53 (p53) and CDKN1A (p21) have been described in adipose tissue of individuals with obesity. However, it is not understood how this systemic inflammation can impact on premature aging of the immune system in individuals with obesity. Thus, the aim of this thesis is to evaluate changes associated with premature immunosenescence in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) exposed to the proinflammatory environment of obesity. We used three different experimental approaches: (1) analysis of parameters associated with premature immunosenescence in healthy PBMC incubated with plasma from individuals with obesity; (2) analysis of immunosenescence parameters in the differentiated U-937 macrophages cell line incubated with plasma from subjects with obesity without comorbidities or with the metabolic syndrome and (3) validation of immunosenescence parameters in PBMC of individuals with obesity. Our results showed that the plasma of individuals with obesity can modulate the phenotype of previously healthy PBMC, inducing increased cell death by apoptosis, compromised signaling of H2AFX and TP53, basal mitochondrial dysfunction associated with ATP production, increased lymphocytes senescent T helper CD4⁺ CD28⁻ and cytotoxic CD8⁺CD28⁻, secretion of inflammatory cytokines and activation of monocytes and macrophages. In addition, the plasma of individuals with obesity, regardless of the presence of comorbidities, induced an increase in the activity of the β -gal enzyme associated with decreased viability of macrophages, associated with increased phagocytic capacity. Some of these data were confirmed in PBMC of individuals with obesity, showing increased rate of cell death by apoptosis, genomic instability through DNA damage repair kinetics, decreased H2AFX signaling and increased micronucleus frequency and karyolysis. Furthermore, we confirmed reduction of TP53/ CDKN2A (TP53/p16) and ERK1/2 pathway signaling and increased secretion of inflammatory cytokines. Taking together, our data confirm the hypothesis of obesity as a pathology associated with premature immunosenescence and genomic instability.

Keywords: DNA damage, H2AFX, immunosenescence, inflammation, mitochondria, macrophages, obesity, immune system.

I.3 LISTA DE ABREVIATURAS*

TP53BP	proteína tumoral 1 de ligação da p53
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ATM	ataxia-telangiectasia mutada
ATP	adenosina trifosfato
ATR	ataxia telangiectasia e relacionada a Rad3
BER	reparo de excisão de bases
β-gal	beta galactosidase
BMCyt	ensaio de micronúcleos bucal
BRCA1	do inglês <i>breast cancer 1</i>
BSA	albumina de soro bovino
CD80	molécula coestimulatória B7.1
CD86	molécula coestimulatória B7.2
CD163	receptor de sequestro haptoglobina-hemoglobina
CD206	receptor de manose de macrófagos
CDK	cinase dependente de ciclina
CDKN2A	inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CDKN1A	inibidor de cinase dependente de ciclina 1A
CDKN1B	inibidor de cinase dependente de ciclina 1B
CEBP-α (ou β)	proteína α (ou β) de união ao estimulador CCAAT
C12FDG	5-dodecanoilaminofluoresceína di-p-D-galactopiranósido
CHK1	cinase de ponto de verificação 1
CHK2	cinase de ponto de verificação 2
CTE	cadeia transportadora de elétrons

CVD	doenças cardiovasculares
DAMP	padrões moleculares associados a dano
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	proteína cinase dependente de DNA
DDR	reparo de dano ao DNA
DSB	quebra de DNA de fita dupla
Dys	dislipidemias
E2F1	fator de transcrição 1 E2F
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FACS	citometria de fluxo
FCCP	cianeto de carbonilo-p-trifluorometoxifenil-hidrazona
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
GI	grande e irregular
GR	grande e regular
H2AFX (H2AX)	membro X da família de histonas H2A
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HMGB1	proteínas do grupo de alta mobilidade
HR	recombinação homóloga
I	irregular
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal
M	mitose
MAPK	proteína-cinase ativada por mitógeno
MIF	fator inibidor de migração de macrófagos

MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos 1
MDC1	proteína mediadora 1 de checagem de dano ao DNA
MDM2	do inglês <i>murine double minute 2</i>
MMR	reparo de incompatibilidade de DNA
MTT	brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
mTORC	proteína alvo de rapamicina de mamíferos
N	normal
NAD⁺	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido
NEHJ	sistema de reparo não-homólogo de junção final
NER	reparo de excisão de nucleotídeos
NF_κB	fator nuclear Kappa B
NII	índice de irregularidade nuclear
NLRP3	domínio de ligação ao nucleotídeo e proteínas que contêm sequencias ricas em leucina 3
PAI-1	inibidor de ativador de plasminogênio
PARP1	poli ADP-ribose polimerase
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PGC-1	receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PMA	phorbol-12-miristato-13-acetato
PR	pequeno e regular
RPLP0	do inglês <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio

SAHF	<i>foci</i> nucleares associados a heterocromatina
SASP	fenótipo secretor associado a senescência
SFB	soro fetal bovino
SM	síndrome metabólica
SSB	quebras de DNA de fita simples
TCLE	termo de consentimento livre esclarecido
TGF-β	fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TP53	proteína supressora de tumor 53
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

* As abreviaturas e o nome descritivo dos genes listados estão de acordo com a *HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC)* (www.genenames.org), organização financiada pela *US National Human Genome Research Institute (NHGRI)* e a *Wellcome Trust (UK)*. PMID:[25361968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25361968/)

I.4 LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. <i>Demographic and clinical data of healthy controls and individuals with obesity</i>	41
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos eutróficos e portadores de obesidade.....	57
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos controles eutróficos e indivíduos portadores de obesidade.....	75
--	----

I.5 LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Visão geral da resposta de dano ao DNA (DDR).....	17
Figura 2. Senescência celular na regeneração e disfunção tecidual.....	19
Figura 3. Impacto da imunosenescência nos linfócitos T.....	25

Capítulo 1

<i>Figure 1. Increased apoptosis in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 2. Plasma from individuals with obesity compromises signaling through cH2AX and p53.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 3. Routine and ATP-linked mitochondrial dysfunction in PBMC exposed to plasma of individuals with obesity.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 4. Immunosenescent phenotype of intact PBMC triggered by plasma from individuals with obesity.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 5. Enhanced cytokine secretion by PBMC exposed to plasma from individuals with obesity.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 6. Monocyte to macrophage differentiation and subsequent activation triggered by acute stimuli from plasma from individuals with obesity.....</i>	<i>46</i>

Capítulo 2

Figura 1. Fluxograma representativo da diferenciação e tratamento da cultura celular da linhagem U-937.	50
--	----

Figura 2. Diminuição da viabilidade e da massa mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade.....	58
Figura 3. Diminuição da massa mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade.....	59
Figura 4. Níveis similares de oxidação de DCF-DA em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com o sem SM e indivíduos eutróficos.....	60
Figura 5. Aumento da atividade da enzima β -galactosidase em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade.....	61
Figura 6. Morfologia nuclear não indica senescência em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade.....	63
Figura 7. Níveis similares de expressão gênica de CDKN1A e CDKN2A em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com e sem SM e indivíduos eutróficos.....	64
Figura 8. Atividade fagocítica de macrófagos incubados com plasma de indivíduos eutróficos e de indivíduos com obesidade.....	65
Figura 9. Aumento da expressão proteica dos marcadores de polarização CD86, CD206 e CD163 em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade e SM.....	66

Capítulo 3

Figura 1. Sinalização da histona H2AFX comprometida em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	76
--	----

Figura 2. Cinética de reparo de dano ao DNA comprometida em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	78
Figura 3. Aumento da frequência de micronúcleos e de cariólise nas células epiteliais da mucosa oral de indivíduos portadores de obesidade.....	79
Figura 4. Aumento da morte celular por apoptose em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	80
Figura 5. Sinalização comprometida da via TP53/CDKN1A (TP53/P21) em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	82
Figura 6. Sinalização comprometida de pERK1/2 em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	83
Figura 7. Sinalização inflamatória em PBMC de indivíduos portadores de obesidade.....	85

Discussão

Figura 1. Visão geral dos principais resultados obtidos nesta tese.....	90
---	----

I.6 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva da integridade e funcionalidade dos tecidos. O declínio funcional sistêmico dos organismos relacionado ao envelhecimento é um dos principais fatores de risco para a morte e para o desenvolvimento de patologias como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, entre outras (Lopez-Otin *et al.*, 2013). O acúmulo de danos celulares é considerado a principal causa do envelhecimento (Vijg e Campisi, 2008, Gems e Partridge, 2013).

Nove fatores que contribuem com o processo de envelhecimento foram propostos e discutidos por Lopez-Otin e colaboradores em seu trabalho denominado “*Hallmarks of aging*” (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Estes fatores foram divididos em três grupos, denominados de (1) marcadores principais, quando são as causas primárias do dano celular, como a instabilidade genômica, o atrito telomérico, as alterações epigenéticas e a perda de proteostase; (2) marcadores antagonistas, quando correspondem a uma resposta celular ao dano primário, como a desregulação na sinalização de nutrientes, a senescência celular e a disfunção mitocondrial; (3) e por último, marcadores integrativos, que são aqueles responsáveis pelo declínio funcional que leva ao fenótipo do envelhecimento, como a exaustão de células-tronco e alteração da comunicação intercelular (Lopez-Otin *et al.*, 2013)

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado afim de elucidar mecanismos associados ao envelhecimento prematuro em doenças crônicas moduladas por estresse oxidativo e inflamação, como é a obesidade (Mundstock *et al.*, 2015, Parisi *et al.*, 2017), doenças psiquiátricas (Barbe-Tuana *et al.*, 2016, Czepielewski *et al.*, 2016, Vasconcelos-Moreno *et al.*, 2017), artrite reumatoide

(Picarelli *et al.*, 2017) e asma (manuscrito em preparação). No contexto da obesidade, através de uma revisão sistemática com metanálise, analisamos 39 trabalhos originais que incluíram 119.439 indivíduos. Nesse trabalho, demonstramos uma tendência moderada de encurtamento de telômeros, indicadores de envelhecimento precoce, em indivíduos portadores de obesidade (Mundstock *et al.*, 2015). Ainda, validamos os resultados obtidos na metanálise em nossa coorte de indivíduos portadores de obesidade, demonstrando telômeros significativamente encurtados e desregulação na expressão gênica das proteínas do complexo *Shelterin* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Além disso, foi possível constatar aumento do dano oxidativo a macromoléculas no plasma destes indivíduos, quando comparados com controles eutróficos (Grun *et al.*, manuscrito submetido para publicação).

Assim, considerando nossos dados prévios de alterações na homeostase telomérica e estresse oxidativo no sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade, nesta tese abordaremos a instabilidade genômica, a senescência celular, a disfunção mitocondrial e a alteração da comunicação intercelular através da inflamação como possíveis fatores envolvidos no processo de envelhecimento prematuro do sistema imune no contexto da obesidade.

I.6.1 Instabilidade genômica e sinalização da histona 2AFX (H2AFX)

Um dos principais fatores que contribuem para o processo de envelhecimento é a instabilidade genômica, a qual possui um papel central na patogênese de diversas doenças, como câncer e doenças degenerativas. As manifestações da instabilidade genômica a nível molecular incluem uma variedade

de alterações nos ácidos nucleicos (DNA), que vão desde modificações em um único nucleotídeo até transformações em todo um cromossomo. Baseado no grau de dano genético, as lesões ao DNA podem ser divididas em três categorias: (1) instabilidade de nucleotídeos, que é caracterizada pelo aumento da frequência de substituição de bases e deleções e inserções de um ou poucos nucleotídeos, (2) instabilidade de microsatélite, que é o resultado de defeitos que levam à expansão ou contração de repetições curtas de nucleotídeos ou microsatélites e por último (3) instabilidade cromossômica, que leva a mudanças no número ou estrutura dos cromossomos e aberrações na arquitetura nuclear (Georgoulis *et al.*, 2017).

O DNA de cada uma das células do organismo acumula milhares de lesões diariamente. Estas lesões podem incluir mutações de ponto, translocações, inserções e deleções de porções extensas nos cromossomos, oxidação de bases, quebras de DNA de fita simples (SSB) e quebras de DNA de fita dupla (DSB). Como contrapartida ao dano ao DNA, as células possuem mecanismos de proteção contra o dano gerado, denominado de resposta de dano ao DNA (DDR), o qual é responsável por reparar os diferentes tipos de danos ao DNA e prevenir assim alterações celulares decorrentes da instabilidade genômica. Os principais mecanismos de DDR incluem três sistemas de reparo de excisão, chamados de reparo de excisão de nucleotídeos (NER), reparo de excisão de bases (BER) e reparo de incompatibilidade de DNA (MMR). Além disso, o sistema de reparo das DSB inclui o sistema de reparo não-homólogo de junção final (NHEJ), que é independente de homologia ou utiliza microhomologia para juntar extremidades quebradas e predomina na fase G1 do ciclo celular, e a recombinação homóloga (HR), que promove reparo preciso ao copiar informações de um molde de DNA homólogo intacto e predomina nas fases S/G2 do ciclo celular (Sirbu e Cortez, 2013, Georgoulis *et al.*, 2017).

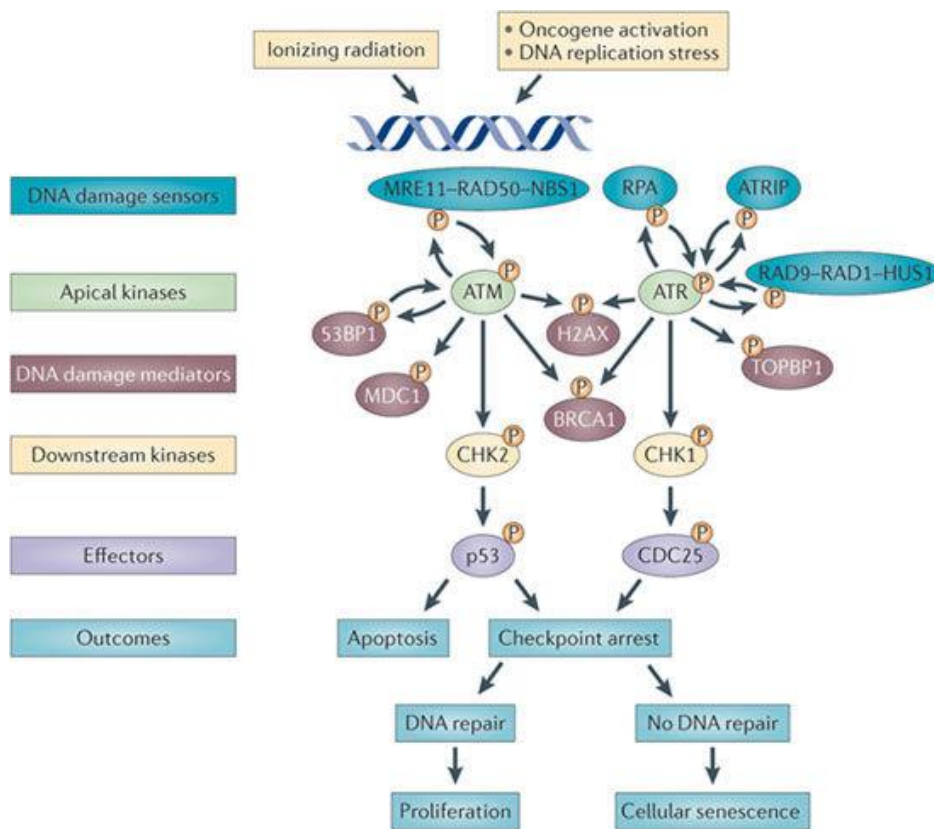
A DDR compõe uma via de sinalização conservada em eucariotos e possui função de inibir, de forma transitória ou permanente, eventos que levam a síntese de DNA em células que apresentam sinais de DNA danificado. A DDR é a via responsável pela coordenação dos mecanismos celulares associados com o reconhecimento e reparo do dano ao DNA, restabelecendo a integridade genômica. As DSB e SSB são potentes ativadores de DDR e mediam a sinalização de resposta principalmente através da fosforilação do membro X da família de histona H2A (H2AFX, previamente denominada H2AX) (Qian e Chen, 2013).

A H2AFX (identificada no repositório do *HUGO Gene Nomenclature Committee* HGNC:4739) é uma proteína que funciona como substrato de várias enzimas do grupo das PIKKs (do inglês *phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases*), como a ataxia-telangiectasia mutada (ATM), a ataxia telangiectasia relacionada a Rad3 (ATR) e a proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK). Entretanto, ATM é considerada a principal mediadora fisiológica da ativação (por fosforilação) de H2AFX em resposta a indução de DSB. Neste contexto, durante a formação de DSB ocorre recrutamento e sinalização de ATM, que, por sua vez, induz o recrutamento e fosforilação de H2AFX na serina 139 (S139), denominada γ H2AFX. A γ H2AFX, juntamente com a proteína mediadora 1 de checagem de dano ao DNA (MDC1), recrutam complexos adicionais de ATM para amplificar e propagar sua própria fosforilação (d'Adda di Fagagna, 2008, Marechal e Zou, 2013, Qian e Chen, 2013). Adicionalmente, γ H2AFX e MDC1 agem de forma coordenada e recrutam proteínas adicionais ao sítio de dano ao DNA, como a nibrina (NBN, previamente denominada NBS1), a proteína tumoral 1 de união a p53 (TP53BP1) e a proteína associada ao reparo do DNA, BRCA1. Por outro lado, H2AFX também pode ser fosforilada pela ATR, durante eventos de SSB, como os presentes em situações de hipóxia ou durante eventos de estresse associados com a replicação, e

pela proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK) durante a fragmentação do DNA na apoptose (Fragkos *et al.*, 2009).

A γ H2AFX se associa ao DNA por centenas de kilobases além do sítio de dano, o que gera uma área molecular de ligação que atrai e retém um grande número de fatores que compõem o complexo de DDR, resultando na formação de múltiplos focos (*foci*) nucleares detectáveis ao microscópio ótico. Na ausência de γ H2AFX, o recrutamento inicial de ATM, que inicia a sinalização de H2AFX, não é afetado. No entanto, o recrutamento secundário decorrente da retroalimentação positiva com formação de *foci* visíveis de ATM e outros fatores de DDR são interrompidos (d'Adda di Fagagna, 2008, Sharma *et al.*, 2012).

No sítio de dano ao DNA, com o aumento local de ATM e ATR, ocorre a ativação das cinases de checagem (*checkpoint kinases* CHK2 e CHK1), que difundem pelo nucleoplasma para fosforilar seus substratos, como a proteína tumoral TP53 (previamente denominada p53), que inicia a cascata de eventos associados com o reparo. Uma vez que o dano ao DNA é reparado, o complexo de DDR é desmontado. No entanto, se o dano ao DNA é persistente e não for reparado, ou a taxa de dano supera a taxa de reparo, o destino da célula tem mais dois desfechos, a ativação de vias de indução de senescência ou morte celular por apoptose (Qian e Chen, 2013). Uma visão geral da DDR está ilustrada na Figura 1.



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Visão geral da resposta de dano ao DNA (DDR). A cascata de sinalização da via de resposta de dano ao DNA é constituída por dois sensores principais de dano: o complexo MRE11–RAD50–NBS1 (MRN), que detecta as quebras de fita dupla (DSB), e a proteína de replicação A (RPA), o complexo RAD9–RAD1–HUS1 e ATRIP, que detectam as quebras de fita simples (SSB). Estes sensores detectam a presença de dano e recrutam as cinases ATM e ATR, respectivamente. A fosforilação de ATM ou ATR converge na fosforilação de H2AFX na serina 139 (γ H2AX) e BRCA1, associadas a região próxima a lesão no DNA. A γ H2AX recruta MDC1 (*DNA damage checkpoint 1*) que sustenta e amplifica a sinalização de DDR ampliando a ativação de ATM. A fosforilação de ATM e ATR leva a ativação das cinases específicas de checagem de cada via, CHK2 (fosforilada por ATM) e CHK1 (fosforilada por ATR), as quais ativam as proteínas efetoras p53 e a proteína de divisão de ciclo celular 25 (CDC25), respectivamente. Essa etapa da DDR é crítica, compromete e direciona a célula a diferentes destinos. Os desfechos da DDR podem ser morte celular por apoptose ou, alternativamente, parada transiente do ciclo celular. Nesse caso, pode direcionar a célula para reparo do dano ao DNA e posterior retomada do ciclo celular e proliferação, ou parada permanente do ciclo celular e indução de senescência celular quando ocorre dano persistente ao DNA não reparado (Adaptado de Sully *et al.*, 2012).

O papel de H2AFX e sua ativação via fosforilação, necessários para o recrutamento das proteínas de reparo, tem sido extensivamente discutido na literatura (Kobayashi *et al.*, 2002, Celeste *et al.*, 2003b, Fragkos *et al.*, 2009). Neste âmbito, vários trabalhos tem mostrado que H2AFX é dispensável para atrair os fatores de reparo aos *foci* de dano, indicando que ela não seria necessária para o

início da DDR, mas sim para sua manutenção (Kobayashi *et al.*, 2002, Celeste *et al.*, 2003b, Fragkos *et al.*, 2009). No entanto, células nocautes para a H2AFX mostram recrutamento de NBS1, 53BP1 e BRCA1 comprometido nos *foci* de dano induzido por radiação, resultando em instabilidade genômica (Celeste *et al.*, 2002, Bassing *et al.*, 2003, Celeste *et al.*, 2003a).

I.6.2 Senescência celular

A senescência celular foi originalmente descrita por Hayflick e Moorhead em cultura de fibroblastos (Hayflick e Moorhead, 1961). Atualmente, é definida como um fenômeno caracterizado pela perda do potencial proliferativo da célula devido a uma parada irreversível do ciclo celular. No entanto, apesar de perderem a capacidade de proliferar, as células senescentes continuam metabolicamente ativas e podem modular o fenótipo de células vizinhas de maneira parácrina através da secreção de moléculas sinalizadoras solúveis (Campisi, 2013, Childs *et al.*, 2015).

Do ponto de vista da morfologia, a senescência celular é acompanhada pelo aumento do tamanho celular e do conteúdo lisossomal, com aumento da atividade da enzima β -galactosidase (β -Gal), diminuição na expressão nuclear de filamentos de lamin B1 e liberação das proteínas reguladoras HMGB1 (do inglês, *High Mobility group box 1 proteins*). Essas modificações geralmente estão correlacionadas com a presença de *foci* de dano ao DNA presentes na heterocromatina, denominados *foci* nucleares associados a heterocromatina (SAHF). Além disso, as células senescentes sofrem profundas alterações em seu secretoma, constituído majoritariamente por citocinas e quimiocinas inflamatórias e por metaloproteinases, as quais são coletivamente chamadas de fenótipo secretor associado a senescência (SASP) (Bernardes de Jesus e Blasco, 2012, Munoz-Espin e Serrano, 2014).

Fisiologicamente, a senescência em organismos adultos é um mecanismo de proteção da célula contra danos moleculares que podem levá-la a uma transformação neoplásica. Assim, a indução transitente de senescência nas células danificadas, seguida da remodelação tecidual e de sua eliminação por células especializadas do sistema imune parece ser benéfica. Por outro lado, a senescência persistente ou a inabilidade do sistema imune em eliminá-las pode ter impactos negativos na função dos tecidos e no potencial regenerativo das células-tronco, acelerando o processo de envelhecimento tecidual, e, conseqüentemente, sistêmico (Figura 2).

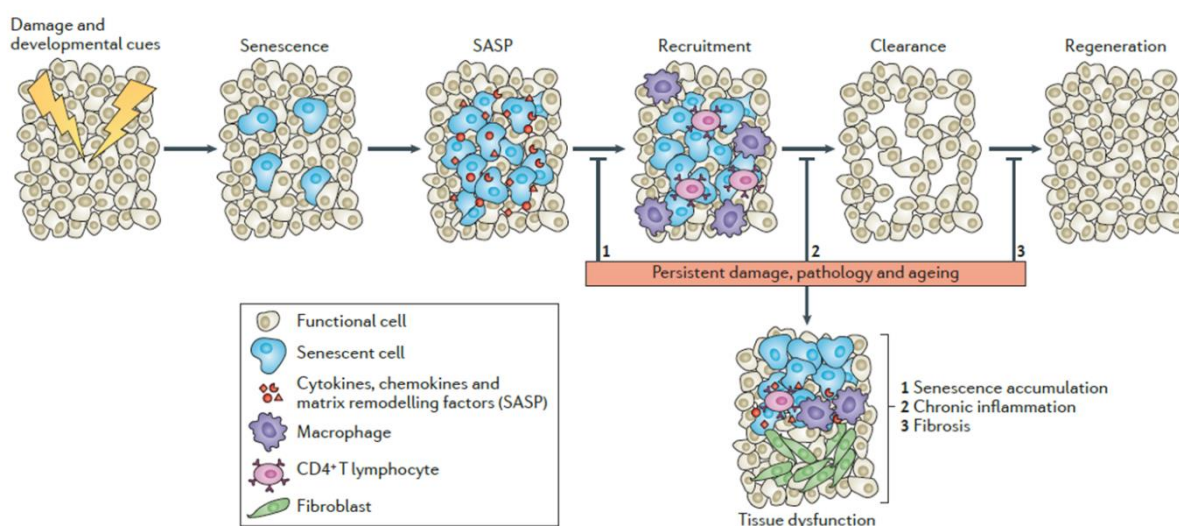


Figura 2. Senescência celular na regeneração e disfunção tecidual. Diferentes tipos de dano celular podem induzir senescência celular nos tecidos. As células danificadas podem se transformar em células senescentes, que, por sua vez, adquirem um perfil secretor alterado e secretam mediadores inflamatórios (SASP). Estes mediadores promovem a quimiotaxia de células imunes ao tecido, principalmente macrófagos e linfócitos, a fim de eliminar as células senescentes. Uma vez que estas células são removidas, ocorre a regeneração tecidual. No entanto, em situações de dano persistente ao DNA, como em diversas patologias e durante o envelhecimento, o sistema imune é ineficiente na remoção de todas as células senescentes, as quais se acumulam nos tecidos e aumentam a inflamação tecidual crônica. A perpetuação do ciclo pode causar disfunção tecidual progressiva e contribuir com o processo de envelhecimento (Adaptado de Muñoz-Espin e Serrano, 2014).

Além disso, o aumento do número de células senescentes em diferentes tecidos está relacionado com várias condições patológicas associadas ao envelhecimento, sendo que sua remoção dos tecidos diminui estas patologias em

modelos animais (Campisi e d'Adda di Fagagna, 2007, Campisi, 2013, Lopez-Otin *et al.*, 2013, Ziegler *et al.*, 2015). Neste contexto, terapias pró-senescentes podem contribuir para minimizar a proliferação de células danificadas, prevenindo a formação de tumores, e terapias senolíticas podem ajudar a eliminar as células senescentes acumuladas nos tecidos e, assim, recuperar e/ou melhorar sua função, prevenindo o envelhecimento (Munoz-Espin e Serrano, 2014).

A senescência celular pode ser induzida em uma célula proliferativa por diversos fatores. Inicialmente, foi postulado que a senescência observada em cultura de células devido a múltiplas passagens ocorre como consequência do encurtamento do telômeros (Blackburn e Gall, 1978), fato que tem sido extensivamente confirmado *in vivo* em células proliferativas (Matsumoto *et al.*, 2015, Bernadotte *et al.*, 2016). No entanto, atualmente sabe-se que a senescência pode ser induzida por outros fatores que causam estresse celular além do encurtamento de telômeros, como irradiação (Havelek *et al.*, 2013), ativação de oncogenes (Chandek e Mooi, 2010), dano oxidativo, disfunção mitocondrial (Ziegler *et al.*, 2015, Wiley *et al.*, 2016) e inflamação (Jurk *et al.*, 2014). Além disso, tem sido elucidado o papel fisiológico da senescência celular no desenvolvimento tecidual durante o período embrionário como mecanismo compensatório da apoptose (Storer e Keyes, 2017; Munoz-Espin e Serrano, 2014).

As principais vias de sinalização envolvidas na parada do ciclo celular para indução de senescência convergem na ativação das proteínas inibidores de cinases dependentes de ciclinas como a CDKN2A (codificada pelo gene *CDKN2A* também denominado p16, p16^{INK4a}, p14 ou p14^{ARF}), CDKN2B (codificada pelo gene *CDKN2B* e também denominado P15 ou p15^{INK4b}), CDKN1A (codificada pelo gene *CDKN1A*, também denominado P21, p21^{CIP1} ou p21^{Cip1/Waf1}) e CDKN1B (codificada pelo gene *CDKN1B* e também denominado KIP1 ou P27KIP1). De maneira geral, a inibição

das cinases dependentes de ciclina resulta em parada do ciclo celular por induzir a hipo-fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), que se liga a proteína 1 da família de fatores de transcrição (E2F)-1 para inibir seus alvos transcricionais, essenciais para a transição das fases G1/S do ciclo celular (Munoz-Espin e Serrano, 2014).

O dano direto ao DNA ativa a senescência principalmente através da proteína TP53. Neste contexto, a TP53 pode ser ativada principalmente em resposta a duas vias celulares. Uma delas é a DDR, mediada pelas proteínas ATM/ATR via CHK1/CHK2. Neste contexto, a ATM fosforila a proteína tumoral TP53 na serina 15 e a CHK2 fosforila a TP53 na serina 20, resultando na dissociação da TP53 do seu inibidor MDM2, o que leva a sua estabilização e ativação das vias subsequentes. A outra via ativada é através da proteína P14^{ARF}, codificada por um transcrito alternativo do locus *CDKN2A*, *INK4A/ARF*. A P14^{ARF} ativa a proteína TP53 por sequestrar a MDM2, prevenindo sua degradação proteolítica (Ben-Porath e Weinberg, 2005, Qian e Chen, 2013). A ativação de TP53 leva ao aumento da expressão de seus genes alvo, entre eles a *CDKN1A* (*P21*), um inibidor de cinase dependente de ciclina, que exerce papel fundamental na indução de parada de ciclo na fase G1 pela inibição dos complexos das ciclinas CDK2 e CDK4 (Qian e Chen, 2013).

Uma via adicional de parada de ciclo celular é a proteína *CDKN2A* (p16^{INK4a}), um indutor de senescência celular ativado pelo estresse celular. A p16^{INK4a} é um inibidor das ciclinas CDK4/6. Uma vez ligada nestas ciclinas, a p16^{INK4a} impede a fosforilação de Rb, que permanece associada ao E2F1, impedindo sua atividade como fator de transcrição. Estudos mostram que a p16^{INK4a} é altamente expressa em situações de estresse celular e sua inativação leva a uma diminuição do desfecho de senescência (Ben-Porath e Weinberg, 2005, Baker *et al.*, 2011, Rayess *et al.*, 2012). Ainda, quando a p53 é inativada, o acúmulo de danos ao DNA

pode levar a indução de senescência através de espécies reativas do oxigênio (ROS), que mediam a expressão de CDKN1A (P16) através da ativação de proteína cinase ativada por estresse p38-MAPK. Assim, é sugerido que CDKN1A (P16) serve como supressor tumoral de suporte para p53 (Rayess *et al.*, 2012).

I.6.2.1 Imunossenescência

A imunossenescência é um termo amplo que caracteriza o declínio funcional do sistema imune como consequência do envelhecimento e envolve não apenas mudanças intrínsecas nas células imunes, mas também modificações no microambiente celular e alterações sistêmicas (Oishi e Manabe, 2016). Neste contexto, o envelhecimento do sistema imune envolve importantes mudanças na organização e funcionalidade imunológica, impactando negativamente na saúde dos indivíduos (Bauer e Fuente Mde, 2016). Embora a senescência celular esteja envolvida em várias alterações relacionadas ao sistema imune durante o envelhecimento, algumas alterações relativas ao estado imunossenesciente dos indivíduos são induzidas independentemente da sinalização de senescência (Oishi e Manabe, 2016).

As alterações da funcionalidade do sistema imune decorrentes da imunossenescência podem ser exemplificadas clinicamente pelo aumento da frequência e severidade de infecções e diminuição da eficácia de vacinas em indivíduos mais idosos. Desta forma, a imunossenescência pode agravar o fenótipo de envelhecimento a nível sistêmico devido a falha do sistema imune em eliminar agentes infecciosos, células infectadas por patógenos, células em transformação

neoplásica e células senescentes de outros tecidos (Ponnappan e Ponnappan, 2011).

A imunossenescência afeta de forma diferencial as células na medula óssea, no timo, os linfócitos maduros presentes no sangue periférico e nos órgãos linfoides secundários e células do sistema imune inato, como são os monócitos e macrófagos. No entanto, as células da imunidade adaptativa sofrem mudanças mais profundas em relação a senescência (McElhaney e Effros, 2009; Ponnappan e Ponnappan, 2011).

As principais mudanças decorrentes da senescência na imunidade adaptativa incluem a diminuição de linfócitos T e B virgens, aumento das células de memória e redução do repertório de receptores de células T (TCR) e de receptores de células B (BCR). Por outro lado, a geração de células mielóides é favorecida, sendo que as células tronco hematopoiéticas apresentam redução do potencial de diferenciação linfóide e aumento do potencial de diferenciação mielóide (Oishi e Manabe, 2016; Young *et al.*, 2016; Zediak *et al.*, 2007).

Uma das alterações mais significativas durante a imunossenescência ocorre na modulação de marcadores de superfície nos linfócitos T, ocasionada pela estimulação antigênica repetitiva. Assim, durante o desenvolvimento das células T, pode-se observar diferentes fenótipos, caracterizados da seguinte maneira: (1) diferenciação inicial (CD27⁺ CD28⁺ CD57⁻ CD45RA⁻ⁱⁱ), (2) virgens (CD27⁺ CD28⁺ CD57⁻ CD45RA⁺ⁱⁱⁱ), (3) diferenciação intermediária (CD27⁻ CD28⁺ CD57⁺ CD45RA^{-iv}) e diferenciação final (CD27⁻ CD28⁻ CD57⁺ CD45RA⁺), as quais seriam as células senescentes (Strioga *et al.*, 2011). A involução do timo no processo de envelhecimento é responsável pela redução da liberação de células T virgens para a circulação, sendo que esta diminuição é mais pronunciada nas células T CD8⁺ em relação a população de células T CD4⁺, podendo resultar em uma razão de

CD4:CD8 invertida (< 1) em 10 a 15% dos indivíduos idosos, fato que está relacionado a disfunção imunológica e aumento de morbidade e mortalidade (Bauer e Fuente Mde, 2016).

Outra importante alteração relacionada a imunossenescência nos linfócitos T está relacionada a perda da expressão da proteína de membrana celular CD28. O CD28 é uma molécula coestimulatória que faz parte da sinapse imunológica e é essencial para ativação dos linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos. Desta forma, o aumento de células T $CD8^+CD28^-$ na circulação sanguínea é um importante marcador de imunossenescência (Valenzuela e Effros, 2002, Chebel *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010, Rizzo *et al.*, 2013)

A expansão das células imunossenescente $CD8^+CD28^-$ ocorre principalmente pela proliferação acentuada dos linfócitos T citotóxicos como consequência da sua exposição a diferentes antígenos durante a vida do indivíduo. Neste sentido, as células $CD8^+CD28^-$ se acumulam principalmente durante infecções virais persistentes, como, por exemplo, nas infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana, o vírus T-linfotrópico humano e o citomegalovírus (Wikby *et al.*, 2002, Gamberg *et al.*, 2004). No entanto, indivíduos com doenças crônicas não-transmissíveis, como o transtorno de humor bipolar, também possuem aumento na frequência das células $CD8^+CD28^-$ circulantes (Rizzo *et al.*, 2013).

A perda da expressão de CD28 na membrana dos linfócitos é, ainda, acompanhada pela diminuição do tamanho dos telômeros e da expressão da enzima telomerase (Effros *et al.*, 1996, Monteiro *et al.*, 1996, Weng *et al.*, 1997, Valenzuela e Effros, 2002). Além disso, tem sido demonstrada uma associação entre o aumento de células $CD8^+CD28^-$ e respostas deficientes a vacinação (Goronzy *et al.*, 2001, Valenzuela e Effros, 2002, Chebel *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010, Rizzo *et al.*, 2013). Ainda, as células $CD8^+CD28^-$ podem contribuir com a inflamação produzindo

grandes quantidades de citocinas inflamatórias como interferon (IFN)- γ , o fator de necrose tumoral (TNF)- α e as interleucinas (IL)-1 β e IL-6 sob estímulos mitogênicos e citotoxinas como perforina e granzima B (Bauer e Fuente Mde, 2016). O fenótipo de um linfócito T imunossenesciente está ilustrado na Figura 3.

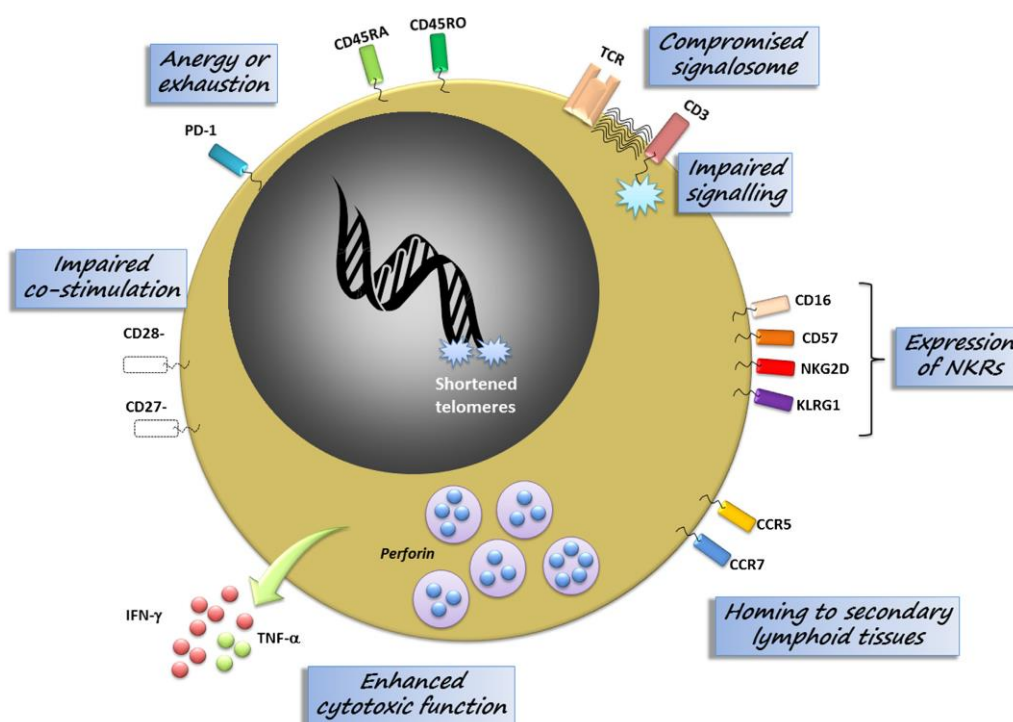


Figura 3. Impacto da imunossenescência nos linfócitos T. Durante o processo de imunossenescência, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ perdem a expressão dos marcadores CD27 e CD28. As células T negativas para CD28 (CD28⁻) apresentam fenótipo imunossenesciente e, assim, várias características efetoras, como secreção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , expressão de perforinas, expressão de receptores de quimiocinas CCR5 e CCR7, telômeros encurtados, perda da expressão da telomerase, expressão de receptores de sinalização negativa como PD-1 e sinalização intracelular comprometida (Adaptado de Bauer e Fuente Mde, 2016).

Em relação ao sistema fagocítico mononuclear, pode-se observar no decorrer do envelhecimento uma diminuição na proporção de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) e aumento dos monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺). Em relação a funcionalidade, há uma diminuição na

produção de ROS, na capacidade fagocítica, na capacidade de migração e de apresentação de antígenos. Além disso, ocorre uma significativa alteração no perfil de secreção de citocinas após a ativação através dos receptores semelhantes a Toll (TLR), com aumento da produção de TNF- α basal e após estímulo de TLR4 e de LPS e de IL-8 após estímulo de TLR1/2, TLR4 e TLR5 (Pinti *et al.*, 2016).

A imunossenescência é um processo fisiológico, no entanto, patologias associadas ao estresse oxidativo e inflamação, como doenças psiquiátricas e doenças metabólicas, podem acelerar este processo. Neste contexto, a imunossenescência tem sido associada a etiologia e desfecho clínico de muitas doenças associadas ao envelhecimento, como obesidade, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, doenças autoimunes, diabetes, câncer, entre outras, sendo proposta com um excelente marcador de morbidade e longevidade nos indivíduos (De la Fuente e Miquel, 2009).

I.6.3 Disfunção mitocondrial

Vários estudos tem evidenciado o papel das mitocôndrias na indução de envelhecimento e senescência celular. Neste âmbito, observações iniciais postularam que a disfunção mitocondrial progressiva que ocorre com o processo de envelhecimento aumenta a produção de ROS, que, por sua vez, amplifica a deterioração mitocondrial e o dano celular (Harman, 1965). Corroborando com esta ideia, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma importante fonte de ROS, é um potente indutor de senescência em vários tipos de células (Ben-Porath e Weinberg, 2005). Por outro lado, várias evidências têm sugerido que as ROS não necessariamente

estão envolvidas com o processo de senescência e/ou envelhecimento. Neste sentido, foi demonstrado que o aumento de ROS pode prolongar a expectativa de vida do nematodo *Caenorhabditis elegans* (Van Raamsdonk e Hekimi, 2009, Yee et al., 2014), e manipulações genéticas que comprometem a função mitocondrial, mas não aumentam a produção de ROS, também tem demonstrado acelerar o envelhecimento (Edgar e Trifunovic, 2009, Hiona et al., 2010, Wiley et al., 2016), sugerindo que a disfunção mitocondrial pode induzir envelhecimento independente da produção de ROS. Ainda, o ROS mitocondrial aumentado na senescência celular pode ser consequência do próprio fenótipo senescente e não necessariamente sua causa (Lawless et al., 2012).

De maneira geral, os mecanismos que causam defeitos na bioenergética mitocondrial incluem acúmulo de deleções e mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), oxidação das proteínas mitocondriais, desestabilização da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e alterações na dinâmica mitocondrial em relação a fissão e fusão. Assim, a combinação do aumento de dano e redução na formação de mitocôndrias contribuem para o envelhecimento celular (Ziegler et al., 2015).

A mitocôndria é a principal fonte de energia para as células. À medida que as células e organismos envelhecem, a eficiência da cadeia respiratória tende a diminuir, aumentando o escape de elétrons (*leak*) e reduzindo a produção de ATP (Green et al., 2011). Assim, o declínio na função da CTE pode levar a senescência prematura. Estudos onde foi realizada inibição dos complexos I, II e III da CTE mostram indução da parada do ciclo celular e senescência nas células estudadas. Ainda, a perda do gradiente de prótons por desacopladores como o fluorocarbonil-cianeto de fenilhidrazona (FCCP) também foi capaz de levar a célula a senescência celular (Stockl et al., 2006, Moiseeva et al., 2009).

O déficit de produção de ATP causado pela disfunção mitocondrial pode induzir senescência através da regulação positiva das proteínas CDKN2A (p16^{INK4}) e CDKN1A (p21^{CIP1/WAF1}) (Stockl *et al.*, 2006). A diminuição da produção de ATP leva ao aumento de adenosina monofosfato (AMP), criando um desbalanço bioenergético na célula (Wang *et al.*, 2003). Recentemente, um estudo mostrou que diferentes formas de dano mitocondrial resultam em senescência celular em células proliferativas, com um SASP representado pela secreção de TNF- α e IL-10, e independente de IL-6. Estas células apresentaram, ainda, aumento da razão NAD⁺/NADH e da razão ADP/ATP e ativação de TP53 mediada pela proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (Wiley *et al.*, 2016). Neste contexto, NAD⁺ é essencial para a atividade das proteínas desacetilases da família das Sirtuinas, as quais estão associadas a longevidade, e da polimerase 1 poly(ADP-ribose) (PARP-1), essencial no reparo do dano ao DNA (Ziegler *et al.*, 2015). Ainda, a AMPK é um sensor energético que induz senescência não apenas pelo aumento da expressão e fosforilação de TP53 e CDKN1A (P21), mas também pela estabilização do mRNA da CDKN2A (p16^{INK4}) (Wang *et al.*, 2002).

A redução da eficiência bioenergética da célula pode também ser decorrente da senescência mediada pelo encurtamento de telômeros. Este fenômeno pode ser explicado pela reduzida biogênese mitocondrial como consequência do encurtamento de telômeros em camundongos deficientes para telomerase, com consequente repressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa e beta (PGC-1 α e PGC-1 β) mediada pela TP53 (Sahin *et al.*, 2011). Neste sentido, o declínio funcional da mitocôndria no envelhecimento pode ser parcialmente revertido pela reativação da telomerase (Bernardes de Jesus e Blasco, 2012). A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo podem, ainda, aumentar a sinalização de NF κ B potencializando o complexo proteico inflamossoma

NLRP3 e, conseqüentemente, o fenótipo inflamatório da senescência (Salminen *et al.*, 2012).

Por outro lado, foi demonstrado que a ausência de mitocôndria é responsável por reduzir o fenótipo senescente, ao mesmo tempo em que a célula mantém a produção de ATP através da glicólise anaeróbica. Ainda, a mitocôndria é responsável pelo fenótipo inflamatório observado na senescência e a fosforilação da cascata ATM-AKT-mTORC1 integra sinais de DDR em direção a biogênese mitocondrial dependente de PGC-1 β , contribuindo para indução de senescência (Correia-Melo *et al.*, 2016).

I.6.4 Alterações na comunicação celular: *Inflamm-aging* e SASP

Inflammaging é um termo que tem sido utilizado para descrever a inflamação sistêmica crônica de baixo grau que ocorre durante o processo de envelhecimento dos indivíduos na ausência de infecções, e que representa um importante fator de risco para desenvolvimento de doenças e mortalidade (Franceschi *et al.*, 2000). Durante o envelhecimento, vários fatores podem contribuir para a indução do *inflammaging*. Neste âmbito, células danificadas pelo envelhecimento podem liberar resíduos como consequência da injúria a organelas. Estes resíduos mimetizam produtos bacterianos, que podem ativar cronicamente a imunidade inata. Outras fontes constantes de inflamação podem ser os produtos produzidos pela microbiota de cada indivíduo, a qual se modifica no decorrer do envelhecimento; a ativação do inflamossoma NLRP3 (domínio de ligação ao nucleotídeo e proteínas que contêm sequências ricas em leucina 3) induzida por padrões moleculares associados a dano

(DAMP) mitocondrial, que é responsável pela secreção de IL-1 β e IL-18; aumento de células senescentes nos tecidos; aumento da ativação da hemostasia, e mudanças no sistema imune, denominadas de imunossenescência (Franceschi e Campisi, 2014).

A produção local de citocinas nos tecidos pode ser responsável pela indução de fenótipos relacionados ao envelhecimento tissular. Neste sentido, os mediadores inflamatórios secretados por células danificadas ou senescentes pode comprometer a estrutura e função dos órgãos. Ainda, o fenótipo secretor inflamatório dos tecidos pode ser responsável pela inflamação crônica a nível sistêmico. Assim, o aumento de citocinas na circulação reflete o vazamento das fontes locais (Coppe *et al.*, 2010). No entanto, ainda não está elucidado se o desbalanço inflamatório é a causa ou um dos efeitos do envelhecimento *per se*.

O SASP é um dos principais mecanismos de indução de inflamação crônica durante o envelhecimento. O SASP é caracterizado por um conjunto de citocinas inflamatórias e metaloproteinases secretadas pelas células senescentes. Este SASP local e limitado é importante para resolver o dano tecidual e para promover o recrutamento de células do sistema imune para eliminação das próprias células senescentes. No entanto, quando em excesso, é responsável por danos que comprometem a estrutura e função dos tecidos, como observado no envelhecimento e em patologias de envelhecimento acelerado, como a presente na obesidade (Rodier e Campisi, 2011).

A resposta inflamatória derivada do SASP é mediada principalmente pelos fatores de transcrição NF κ B e a proteína β de união ao estimulador CCAAT (CEBP- β), e inclui a secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento como o TGF- β e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e diversas proteases. A IL-6 é a citocina mais fortemente

relacionada ao SASP e a que mais varia durante o envelhecimento e as patologias crônicas, tendo um potente componente pró-inflamatório. Outros marcadores inflamatórios importantes no SASP e presentes durante o *inflammaging* incluem IL-1 β e TNF- α , as quais possuem ações pleiotrópicas no estímulo de resposta imune (Franceschi *et al.*, 2000). A expressão dos componentes SASP como IL-6 e o inibidor de ativador plasminogênio (PAI-1) é maior em células senescentes com expressão positivas da proteína CDKN2A (P16) (Baker *et al.*, 2011).

O SASP, através de sua ação inflamatória e seus fatores de remodelação tecidual, faz com que as células senescentes sejam capazes de alterar o microambiente tecidual e induzir sinalização nas células vizinhas de maneira parácrina (Freund *et al.*, 2010). Neste sentido, já foi demonstrado que células senescentes induzem DDR nas células intactas ao seu redor em um processo envolvendo ROS *in vitro* (Nelson *et al.*, 2012). Ainda, a senescência induzida de forma parácrina pelo SASP é uma resposta complexa envolvendo inflamossomas e sinalização de IL-1, conforme demonstrado em modelo de senescência induzida por radiação em cultura e *in vivo*, em animais e humanos (Acosta *et al.*, 2013).

1.6.7 Obesidade como modelo de imunossenescência prematura

A obesidade é uma condição patológica associada a expansão do tecido adiposo e a uma inflamação crônica de baixo grau que exerce diversos efeitos negativos em múltiplos tecidos (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017). Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial, sendo que, de acordo com a OMS, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso ou obesos em 2016 (WHO, 2017). O principal fator etiológico da obesidade é o desbalanço energético. No

entanto, fatores genéticos, sociais, comportamentais e culturais também possuem grande relevância no desenvolvimento desta patologia (Gregor e Hotamisligil, 2011, Castro, 2012)

Durante o estabelecimento da obesidade, ocorre o aumento da síntese de triglicerídeos como consequência do superávit energético no organismo. Com isso, os triglicerídeos acumulam-se progressivamente nos adipócitos, causando sua hipertrofia e, conseqüentemente, sua ruptura quando atingem um alto limiar de saturação. A ruptura dos adipócitos é responsável pela liberação de fatores inflamatórios no meio extracelular, os quais desencadeiam uma resposta ao estresse celular com concomitante recrutamento de macrófagos. Este processo leva a produção de ácidos graxos livres; adipocinas como leptina e resistina; fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), PAI, fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), proteína C reativa (C-RP) e citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-18 e IL-6 (Redinger, 2007, Monteiro e Azevedo, 2010, Gregor e Hotamisligil, 2011, Castro, 2012, Nishimoto *et al.*, 2016). Além disso, à medida que a capacidade de expansão dos adipócitos hipertrofiados se torna saturada, as moléculas de triglicerídeos em excesso recém-sintetizadas não tem espaço suficiente para acumular no tecido adiposo subcutâneo e são armazenadas em locais indesejados, como fígado, coração, rins e pâncreas. Esta deposição de gordura ectópica também gera um ambiente aterogênico, diabetogênico e inflamatório no organismo, sendo que a inflamação nestes tecidos possuiu grande contribuição no desenvolvimento das doenças metabólicas (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017).

Com o avanço da obesidade, o organismo procura restaurar sua homeostase. Assim, a inflamação possui importante papel na promoção da angiogênese para prevenir a hipóxia no tecido adiposo e na indução da resistência a insulina para

limitar a taxa de acúmulo de energia nas células adiposas. No entanto, este novo limiar de homeostase possui flexibilidade metabólica reduzida e pode resultar em doenças associadas a obesidade (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017).

A obesidade possui várias comorbidades associadas ao envelhecimento e a mortalidade precoce (Gregor e Hotamisligil, 2011, Castro, 2012), entre elas estão o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), as dislipidemias (Dis), as doenças cardiovasculares (CVD) e alguns tipos de câncer. Além disso, os indivíduos com obesidade podem desenvolver síndrome metabólica (SM), que é caracterizada por um conjunto de fatores de risco reversíveis para CVD e DM2. Os principais componentes do diagnóstico de síndrome metabólica são níveis de colesterol HDL reduzidos, triglicerídeos aumentados, pressão arterial aumentada e glicemia de jejum aumentada associados ao acúmulo de gordura intra-abdominal ectópica, avaliada pela circunferência abdominal (Han e Lean, 2016)

Por outro lado, o fenótipo de obeso metabolicamente saudável é usado para descrever indivíduos que não atendem os critérios clínicos da síndrome metabólica. Durante a fase adulta, o principal preditor para conversão do fenótipo saudável para o não saudável é o acúmulo de gordura visceral. Além disso, o fenótipo saudável tende a ser um fenômeno transitório, visto que é uma questão de tempo até que o indivíduo com obesidade apresente complicações relacionadas a doença (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017).

Além da inflamação, o tecido adiposo de indivíduos com obesidade apresenta evidências de senescência celular, como atividade da enzima β -galactosidase aumentada, presença de SASP e regulação positiva da expressão de TP53 e CDKN1A (P21). Neste contexto, os adipócitos senescentes também contribuem para a inflamação observada na obesidade através da secreção de SASP (Tchkonia *et al.*, 2010). Ainda, os hormônios secretados pelo tecido adiposo como a leptina

conectam o tecido adiposo com o sistema imune diretamente, induzindo um perfil inflamatório nas células imunes em nível periférico. Todos estes fatores em conjunto participam da formação de uma inflamação crônica de baixo grau sistêmica presente na obesidade, semelhante àquela observada durante o envelhecimento, denominada de *meta-inflammation* (Gregor e Hotamisligil, 2011). No entanto, é pouco explorado na literatura como esta inflamação sistêmica pode impactar no possível envelhecimento prematuro do sistema imune.

Desta forma, considerando que (1) indivíduos obesos possuem um *milieu* inflamatório e oxidativo crônico que está constantemente induzindo alterações moleculares nas células, (2) que nossos dados preliminares confirmam esta hipótese mostrando que estes pacientes possuem telômeros encurtados, e que (3) o secretoma de células senescentes pode modular células saudáveis, induzindo um perfil inflamatório e/ou senescente, avaliamos, paralelamente, o efeito do plasma de indivíduos portadores de obesidade sobre marcadores de instabilidade genômica, de morte celular, de função mitocondrial e de imunossenescência em linfócitos e monócitos/macrófagos previamente saudáveis e confirmamos algumas das alterações encontradas em PBMC extraídas diretamente dos indivíduos com obesidade.

I.7 OBJETIVOS

I.7.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações associadas a imunossenescência prematura e ativação imunológica em células mononucleares de sangue periférico e macrófagos expostos ao ambiente pró-inflamatório presente na obesidade.

I.7.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

Avaliar os efeitos do plasma de indivíduos portadores de obesidade sobre parâmetros associados ao fenótipo de imunossenescência prematura em células mononucleares de sangue periférico de indivíduo saudável não relacionado.

Capítulo 2

Comparar os efeitos do plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade com síndrome metabólica sobre parâmetros associados ao fenótipo de imunossenescência prematura e ativação de macrófagos diferenciados na linhagem celular U-937.

Capítulo 3

Explorar parâmetros de instabilidade genômica e inflamação, características de imunossenescência prematura, em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade.

PARTE II

II.1 Artigo “Immunosenescence induced by plasma from individuals with obesity caused cell signaling dysfunction and inflammation”

(Publicado no periódico *Obesity*, Fator de Impacto: 3,873, Qualis A2)

Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation

Mariana Migliorini Parisi^{1,2}, Lucas Kich Grun^{1,2}, Patrícia Lavandoski¹, Letícia Biscaino Alves³, Ivi Juliana Bristot^{2,4}, Rita Mattiello⁵, Cláudio Corá Mottin³, Fábio Klamt^{2,4}, Marcus Herbert Jones⁵, Alexandre Vontobel Padoin³, Fátima Costa Rodrigues Guma⁶, and Florencia María Barbé-Tuana^{1,2}

Objective: To evaluate the consequences of plasma from individuals with obesity on parameters associated with immunosenescence in unrelated healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Methods: Freshly isolated PBMC were incubated in media supplemented with 10% of plasma from individuals with obesity or control subjects for the first 4 hours of 24 to 120 hours of culture.

Results: Plasma from individuals with obesity modulated the phenotype of healthy PBMC, leading to a higher rate of apoptosis, lower amounts of phospho- γ H2AX and -p53, and mitochondrial dysfunction. After 120 hours, there was a higher secretion of inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. CD8⁺ T lymphocytes presented decreased expression of CD28, which is associated with the immunosenescent phenotype. CD14⁺ macrophages showed increased expression of CD80 and CD206, suggesting a modulation in the activation of macrophages.

Conclusions: These results demonstrate that chronic systemic inflammation observed in obesity induces dysfunctional features in PBMC that are consistent with premature immunosenescence.

Obesity (2017) **00**, 00–00. doi:10.1002/oby.21888

Introduction

Cellular senescence has been described as a state of permanent proliferative arrest of dividing cells (1). An increased proportion of senescent cells is detected in aged organisms or tissues and compromises tissue-repair capacity in the elderly (2,3). Fibroblast from older baboons also shows a time-dependent accumulation of DNA-damaged foci, another feature of senescent cells (4), and an increased presence of senescent cells has been reported in patients with chronic diseases such as diabetes (5) or atherosclerosis (6). In this regard, several lines of evidence suggest that senescence could have a causal effect on age-related tissue dysfunction, suggesting a common underlying mechanism between senescent cells, aging, and chronic diseases. Aging is also connected to a progressive impairment of the immune system. Age-associated functional decline of

the immune compartment, increased production of inflammatory molecules, augmented release of oxidative stress mediators, and an imbalance toward increased circulating myeloid cells are observed during immunosenescence (7).

Senescent cells secrete large amounts of proinflammatory molecules and extracellular matrix proteases, called senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP can induce DNA, protein, and lipid damage in a paracrine way and might transform healthy cells, compromising cells' fate, tissue organization, and function (8), eventually leading to a systemic impairment of the organism. The molecular mechanisms associated with senescence induction in cellular response to genotoxic stress (DNA damage) involve the activation of a highly coordinated and regulated pathway called the DNA damage response (DDR). This pathway involves signaling of DNA

¹ Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Correspondence: Florencia María Barbé-Tuana (barbe.tuana@ufrgs.br) ² Postgraduate Program of Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil ³ Center of Obesity and Metabolic Syndrome, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil ⁴ Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil ⁵ Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil ⁶ Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology of Lipids, Department of Biochemistry, ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Funding agencies: MMP, FK, MHJ, and FTCRG received a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), grant 479305/2009-9; FMBT and LKG received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and PL received a fellowship from Fapergs, Pesquisador SBI BD Biosciences 2013.

Disclosure: The authors declared no conflicts of interest.

Author contributions: MMP, LKG, LBA, RM, CCM, FK, MHJ, AVP, FTCRG, and FMBT designed the study. MMP, LKG, PL, IJB, LBA, CCM, FK, FTCRG, MHJ, AVP, and FMBT executed the experiments and analyzed the data. MMP and FMBT were involved in writing the manuscript. RM, CCM, FK, MHJ, AVP, and FTCRG revised the manuscript for intellectual content. All authors had final approval of the final submitted version.

Received: 5 March 2017; **Accepted:** 25 April 2017; **Published online** 00 Month 2017. doi:10.1002/oby.21888

damage through recruitment and phosphorylation of histone H2AX and the p53/p21 or p16 axis (2). Dysfunctional mitochondria also accumulate with age and can induce cellular senescence *in vitro* and *in vivo* (9,10).

Metabolic changes in white adipose tissue of individuals with obesity show increased infiltrating macrophages and senescent cells in fat tissue, contributing to oxidative stress and inflammation (11). Local deregulation is also reflected at a systemic level. Augmented circulating levels of inflammatory cytokines and pro-oxidant molecules are observed in the periphery contributing to the pathogenesis of obesity (11). In the past few years, many studies have demonstrated deleterious consequences of sustained inflammation and oxidative stress in obesity, such as DNA damage (12), telomere shortening (13), and premature senescence (14).

Because obesity and aging share similar features, such as reactive oxygen species (ROS) production and a wide array of pro-inflammatory cytokines associated with an impaired immune system, obesity is considered an aging disease associated with common mechanisms of premature immunosenescence (15). In this report, we incubated healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with plasma from individuals with obesity and analyzed the induction of the SASP in the long term. Our experimental model triggered compromised signaling of key features of the DDR, mitochondrial dysfunction, cytokine secretion, and immune deviation of T lymphocytes toward an immunosenescent phenotype.

Methods

Subjects

This study included 9 individuals with morbid obesity ($BMI \geq 35.0 \text{ kg/m}^2$) and 9 healthy controls ($18.5 \text{ kg/m}^2 \geq BMI \leq 24.9 \text{ kg/m}^2$). All participants with morbid obesity were recruited at the Center of Obesity and Metabolic Syndrome unit at São Lucas Hospital at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. The Institutional Review Board from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (N° 760.537) and Universidade Federal do Rio Grande do Sul (N° 640.817) approved this protocol. Eutrophic control individuals with no chronic inflammatory diseases were recruited from the community. A unique donor for each unrelated plasma sample was used as a donor of PBMC for cell culture experiments at different times ($n = 9$). All participants were older than 18 years and provided written informed consent.

Blood collection

Ten milliliters of peripheral blood were drawn from each subject by venipuncture into EDTA tubes. Blood was immediately centrifuged at 2,000 rpm for 10 minutes at 4°C for plasma separation. Collected plasma was aliquoted and stored at -80°C until needed.

Cell culture

PBMC were isolated by density gradient (Histopaque 1.077 g/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) according to manufacturer's instructions. Purified PBMC were counted manually with a hemocytometer and used if viability, assessed by exclusion of trypan blue, was greater than 95%. PBMC were cultured in 6 or 12 well plates at 1×10^6 cells/mL in RPMI-1640 medium (Sigma Aldrich)

supplemented with 10% of plasma from individuals with obesity or healthy controls, 2 g/dL HEPES buffer (Sigma Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich), pH 7.4 in a humidified chamber incubated at 37°C with 5% CO₂ for 4 hours. For experiments, media was removed, cells were washed and replaced with RPMI media supplemented with 10% of fetal bovine serum (RPMI 10% FBS), and cultured for an additional 24 or 120 hours (Figure 1A).

Cell viability assays

Apoptosis and necrosis of cultured PBMC was analyzed with Annexin-V/PI (BD Biosciences, San Jose, California) staining according to manufacturer's instructions. Twenty-thousand events were acquired in an BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with BD Accuri C6 software (BD Biosciences). Metabolic activity of total NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase enzymes was evaluated by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Sigma Aldrich) as previously described (16).

Detection of intracellular phosphoproteins γ H2AX and p53

Phosphorylation levels of γ H2AX and p53 of cultured PBMC was evaluated by phosflow. The staining protocol consisted of an initial step of fixation and permeabilization by addition of Perm/Fix Buffer (BD Biosciences) for 40 minutes at 4°C. Cells were then washed twice with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and resuspended in 100 μL of Perm/Wash buffer (BD Biosciences) with anti-phospho-H2AX (pS139, 1:20) conjugated to Alexa Fluor® 488 (BD Biosciences) and anti-phospho-p53 (pS37, 1:5) conjugated to Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences) for 60 minutes at 4°C. Finally, cells were centrifuged and resuspended in Perm/Wash buffer. Acquisition (50,000 events) and analysis was done as reported.

Mitochondrial high-resolution respirometry

Mitochondrial physiology was measured by high-resolution respirometry in an oxygraph (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Cultured PBMC were placed in the 2-mL oxygraph chamber at a final concentration of 9×10^6 cells/mL of RPMI-1640 without serum as respiration media. Measurements were performed at a constant temperature of 37°C. Oxygen concentration and oxygen flux, which are directly proportional to oxygen consumption, were recorded with DatLab 4.3 (Oroboros Instruments). All experiments were performed at an oxygen concentration of 50 μM . First, basal oxygen consumption was recorded for 10 to 20 minutes. After stabilization of oxygen consumption, adenosine triphosphate (ATP)-synthase inhibitor oligomycin (1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Aldrich) was added to induce a state 4-like respiration independent of mitochondrial ATP production in which oxygen consumption is a consequence of proton leakage across the inner mitochondrial membrane. Maximal respiration, or oxygen consumption, was obtained by stepwise titration of the uncoupler carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, Sigma Aldrich) until no additional increase in oxygen consumption was detected. Finally, the mitochondrial respiration was inhibited by adding potassium cyanide (KCN, Sigma Aldrich) in order to inhibit complex IV of the electron transport chain with no further decrease in oxygen consumption. The net residual oxygen flux reflects nonmitochondrial oxygen consumption and was subtracted from other respiration values. ATP-linked oxygen consumption was calculated as basal

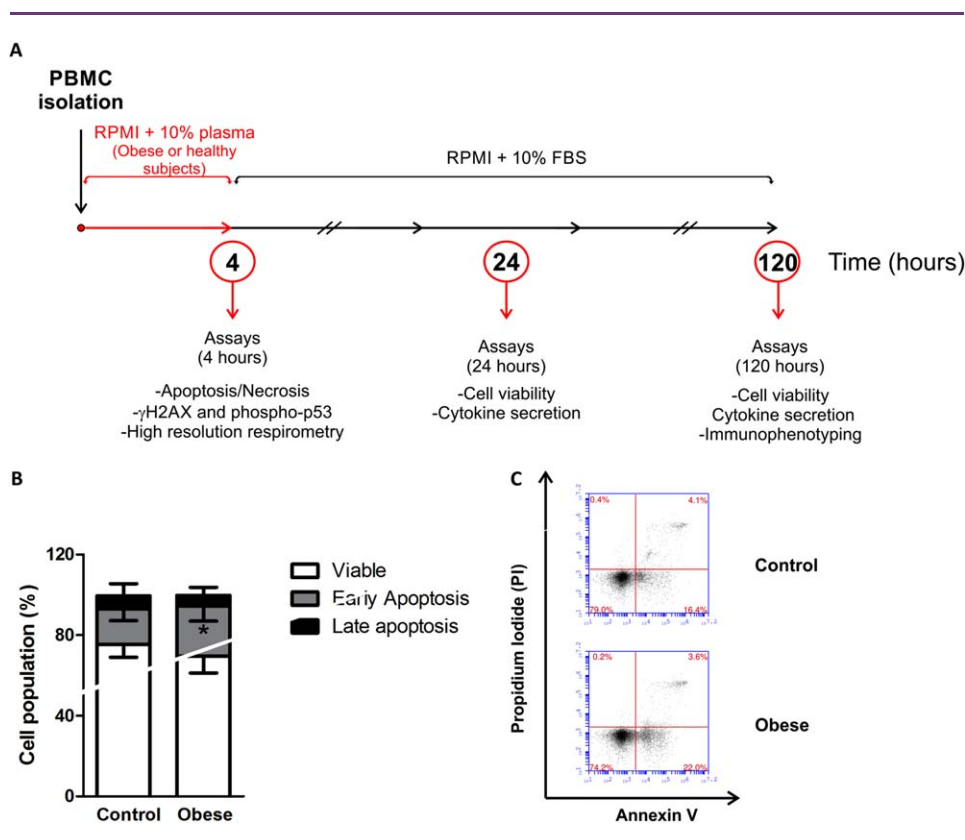


Figure 1 Increased apoptosis in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity. (A) Workflow diagram. (B) Annexin-V and propidium iodide staining by flow cytometry. Plot showing significant increased early apoptosis in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity after 4 hours of treatment. (C) Representative flow cytometry dot plot analysis in PBMC. Data presented as mean \pm standard deviation. Significant differences considered when $P < 0.05$ (*). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

respiration minus leak respiration. Reserve respiratory capacity was calculated as maximal respiratory capacity minus basal respiration.

Quantification of inflammatory cytokines

Cytokine secretion was measured in the culture medium of PBMC by Cytometric Bead Array with the Human Inflammatory Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer’s instructions. The samples were acquired in the Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the FCAP Array v3.0.1 software for BD CBA Analysis (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). Results are expressed as picograms per milliliter (pg/mL). The detection limits of the assays were 3.6 pg/mL for IL-8, 7.2 pg/mL for IL-1 β , 2.5 pg/mL for IL-6, 3.3 pg/mL for IL-10, 3.7 pg/mL for TNF- α , and 1.9 pg/mL for IL-12.

Evaluation of senescent and inflammatory cell surface markers

Immunophenotyping was performed to analyze the expression of the lymphocyte senescent marker CD28⁺ (anti-CD28 APC, 1:10) in CD4⁺ and CD8⁺ cells (Tritest anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE, anti-CD3 PerCP, 1:10) and macrophage activation markers CD80 (anti-CD80 PE, 1:10), CD206 (anti-CD206 PE-CyTM5, 1:10), and HLA-

DR (anti-HLA-DR APC, 1:10) in CD14⁺ (anti-CD14 FITC, 1:10) cells after 120 hours of culture. Cells were stained with corresponding fluorochrome-labelled antibodies in staining buffer and incubated for 30 minutes at 4°C in the dark. Cells were then washed with staining buffer, and 20,000 events were acquired and analyzed in the monocyte or lymphocyte gates. All antibodies and reagents used were from BD Biosciences (San Jose, California).

Statistics

Statistical analysis was performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS v.19 for Windows, IBM Corp., Armonk, New York) and GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California). The groups (eutrophic healthy controls vs. individuals with obesity) were compared using Student *t* test or Mann-Whitney U-test. All analyses were 2-tailed, and significance was set at $P < 0.05$. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Results

Demographic data is depicted in Table 1. There was no significant difference in age and sex. As expected, individuals with obesity had a higher BMI than healthy controls ($P < 0.0001$).

TABLE 1 Demographic and clinical data of healthy controls and individuals with obesity

	Healthy controls (n = 9)	Individuals with obesity (n = 9)	P value
Sex, male (%)	4 (44.4)	3 (33.3)	n.s.
Age, mean (SD)	29.8 (4.34)	35.8 (3.83)	n.s.
BMI, mean (SD)	21.3 (1.2)	50.3 (7.8)	< 0.0001
Comorbidities (%)			
SH	–	6 (66.6)	
DM2	–	4 (44.4)	
MS	–	7 (77.7)	
DYS	–	7 (77.7)	
HS	–	3 (33.3)	

DM2, type 2 diabetes mellitus; DYS, dyslipidemia; HS, hepatic steatosis; MS, metabolic syndrome; n.s., not significant; SH, systemic hypertension.

Increased apoptosis in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity

Plasma from patients with obesity is characterized by differential expression of circulating proteins and metabolites such as inflammatory cytokines, oxidative mediators, and adipokines that can be toxic to different tissues (17). To determine the impact of plasma from individuals with obesity on cell viability, we evaluated the percentage of cells in apoptosis and necrosis by Annexin-V and PI staining. We incubated PBMC from unrelated donor for 4 hours with RPMI supplemented with 10% plasma from individuals with obesity or from eutrophic healthy controls. A workflow diagram is depicted in Figure 1A. We observed an increased percentage of cells in early apoptosis in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity (Figure 1B-1C). Similar results were obtained at 2 and 6 hours of incubation (data not shown).

Plasma from individuals with obesity compromises signaling through γ H2AX and p53

Cell apoptosis is associated with DNA damage and has been documented in adipose tissue from humans and mice (18). However, the augmented apoptosis of circulating leukocytes is still under debate. In order to dissect consequences of the increased cell death in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity, we assessed whether these healthy cells had higher DNA damage signaling through γ H2AX and p53 phosphorylation. Surprisingly, PBMC exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours showed decreased γ H2AX (Figure 2A-2B) and p53 (Figure 2C-2D) phosphorylation in viable cells.

Decreased routine and ATP-linked mitochondrial respiration in PBMC exposed to plasma of individuals with obesity

Loss of mitochondrial function can drive age-related decline in tissue function (10). Therefore, to further evaluate whether plasma from individuals with obesity was able to induce mitochondrial dysfunction, we performed a high-resolution respirometry assay. We observed that PBMCs acutely exposed to plasma from individuals with obesity

for 4 hours showed reduced basal (routine) and ATP-linked oxygen consumption (Figure 3A-3B). We also evaluated cell metabolism and viability after 24 and 120 hours of PBMC culture by MTT (Figure 3C). We confirmed energy deficiency in PBMC exposed to plasma from patients with obesity after 24 hours ($P = 0.01$) and 120 hours ($P < 0.001$). Our results emphasize the noxious effect of plasma of individuals with obesity on immune cells.

Plasma from individuals with obesity modulates PBMC into an immunosenescent phenotype

As PBMC exposed to plasma from individuals with obesity showed signs of cell dysfunction, we wanted to know whether viable cells might become senescent after 120 hours of culture. We observed that plasma from individuals with obesity induced an increase in the percentage of immunosenescent TCD8+CD28- cells in healthy PBMC (Figure 4A-4C). Furthermore, CD4+CD28+ and CD8+CD28+ T cells showed a downregulation of the costimulatory molecule CD28 (Figure 4B-4C), suggesting the modulation of cytotoxic T lymphocytes into a senescent phenotype in the lymphoid compartment.

Increased cytokine secretion from PBMC exposed to plasma of individuals with obesity

Individuals with obesity present a low-grade inflammation. Indeed, in synergy with chronic activation of the immune system, this inflammatory status can be aggravated by the higher percentage of senescent cells that secrete bioactive molecules. In this regard, we evaluated whether plasma from individuals with obesity was capable of modulating the secretory inflammatory phenotype of PBMC after 24 and 120 hours of culture. After 120 hours of culture, we found that IL-1 β and IL-8 (Figure 5) were significantly boosted following exposure to plasma from individuals with obesity for 4 hours, compared to healthy patients. IL-12 was not detected in any analyzed sample. Together with our previous data, these results support the deleterious effect of plasma from patients with obesity, suggesting that peripheral activation of immune system cells might indeed aggravate the SASP phenotype in obesity.

Increased macrophage activation markers in PBMC exposed to plasma of individuals with obesity

The degree of proinflammatory macrophage infiltration in white adipose tissue is associated with obesity (19). We asked whether the systemic inflammation observed in obesity can activate and differentiate monocytes into inflammatory macrophages after 120 hours of culture. While we did not observe significant differences in CD14 and HLA-DR expression markers, we detected increased expression of the costimulatory molecule CD80 and the mannose receptor CD206 in CD14+ gated cells from PBMC exposed to plasma from individuals of obesity (Figure 6). Our *ex vivo* results reinforce a paracrine effect for the systemic activation of the immune system in obesity.

Discussion

Obesity is a multifactorial disorder that is strongly associated with accelerated aging and reduced life expectancy (15). In this study, we show that plasma from individuals with obesity induced increased

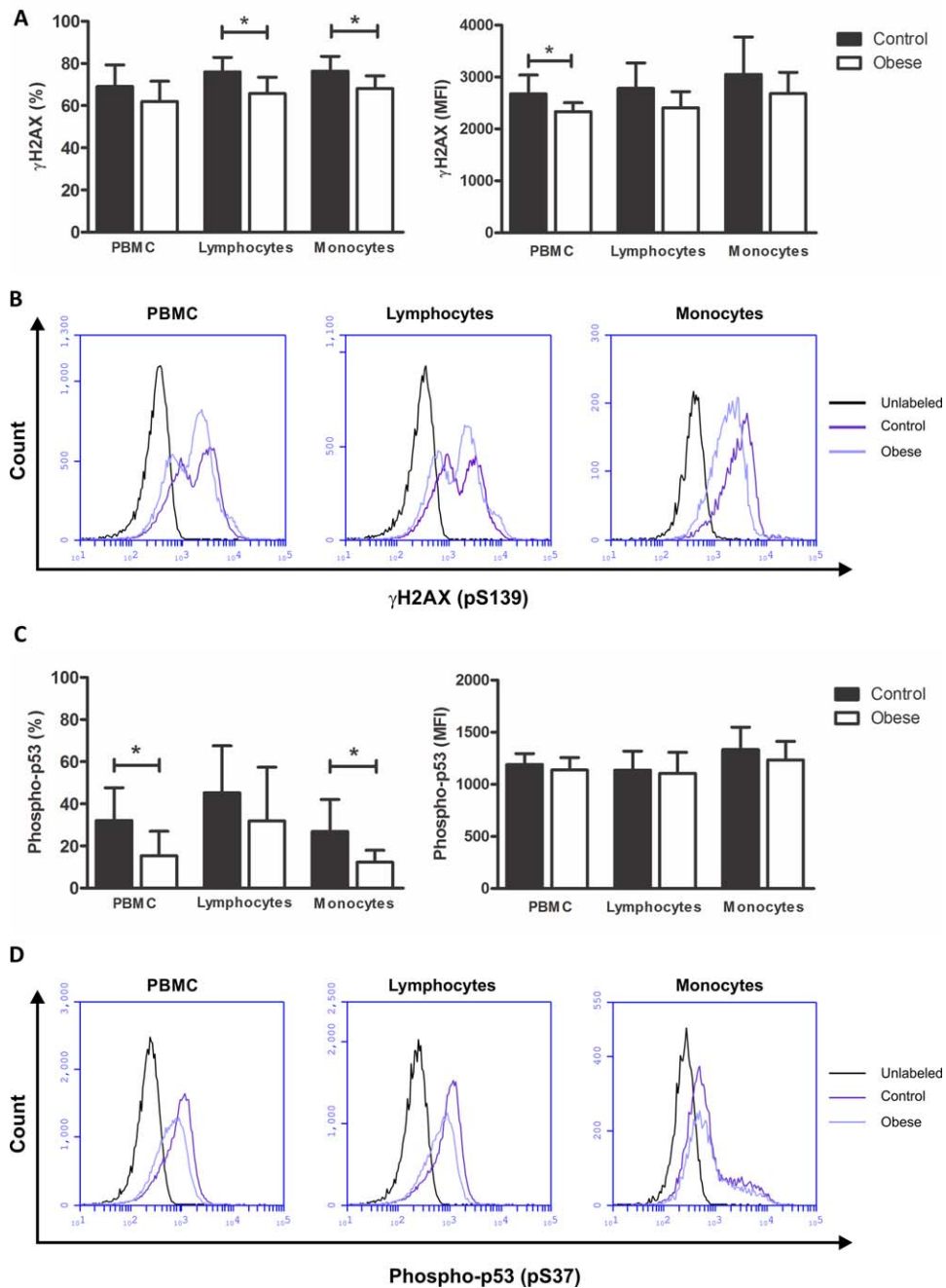


Figure 2 Plasma from individuals with obesity compromises signaling through γ H2AX and p53. **(A)** Phosflow analysis showing significant reduction of H2AX phosphorylation (pS139) in PBMC and in gated lymphocytes and monocytes (based in FSC xSSC) exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours. **(B)** Representative histograms of H2AX phosphorylation (pS139) in PBMC and gated lymphocytes and monocytes (based in FSC xSSC) exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours. **(C)** Phosflow analysis showing significant reduction of p53 phosphorylation (pS37) in PBMC and in gated lymphocytes and monocytes (based in FSC xSSC) exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours. **(D)** Representative histograms of p53 phosphorylation (pS37) in PBMC and in gated lymphocytes and monocytes (based in FSC xSSC) exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours. Data presented as mean \pm standard deviation. Student *t* test or Mann-Whitney U-test performed when appropriate. Significant differences considered when $P < 0.05$ (*). MFI: median fluorescence intensity. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

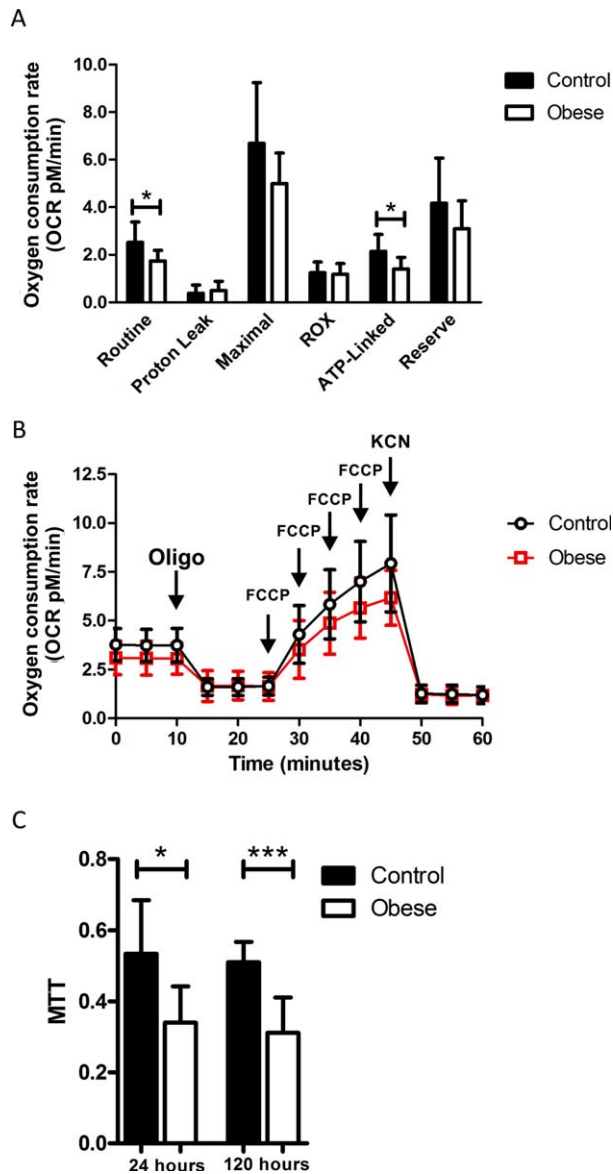


Figure 3 Routine and ATP-linked mitochondrial dysfunction in PBMC exposed to plasma of individuals with obesity. (A) Bar plot showing reduced routine and ATP-linked oxygen consumption rate (OCR) in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity for 4 hours. Data are presented as mean \pm standard deviation. (B) Representative curve of 3 points of OCR analyses in 4 stages of high-resolution respirometry assay (Oxygraph-2k). First, basal oxygen consumption was recorded for 10 to 20 minutes. After stabilization of oxygen consumption, ATP-synthase inhibitor oligomycin (oligo) was added to induce a state 4-like respiration independent of mitochondrial ATP production in which oxygen consumption is a consequence of proton leakage across the inner mitochondrial membrane. Maximal oxygen consumption was obtained by stepwise titration of the uncoupler carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) until no additional increase in oxygen consumption was detected. Finally, the mitochondrial respiration was inhibited by adding potassium cyanide (KCN) in order to inhibit complex IV of the electron chain transporter, with no further decrease in oxygen consumption. The net residual oxygen flux reflects nonmitochondrial oxygen consumption and was subtracted from all respiration values. (C) MTT analysis. Plot showing reduced viability and energy deficit in PBMC cultured for 24 and 120 hours after 4 hours of exposure to plasma from individuals with obesity. *t* test or Mann-Whitney U-test performed when appropriate. Data presented as mean \pm standard deviation. Significant differences considered when $P < 0.05$ (*) and when $P < 0.0001$ (***). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

apoptosis of intact PBMC. In addition, viable PBMC showed reduced signaling through γ H2AX and p53 pathways and mitochondrial dysfunction linked to reduced routine and ATP production. Plasma from patients with obesity modulated specific T lymphocytes into an immunosenescent phenotype associated with increased secretion of proinflammatory cytokines. Our findings support a causal dysfunctional response of PBMC triggered by the systemic inflammation in individuals with obesity.

Available data from proteome and genome-wide analyses arrays have identified particular genes or single nucleotide polymorphisms from the signaling glucose pathway, named insulin growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein (IGFBP-3) present in plasma, associated with DM2, cancer, mortality (20), and age-related diseases (21). In addition, adipocytes secrete adipokines such as leptin and adiponectin, vascular endothelial growth factor, plasminogen activator inhibitor 1, macrophage migration inhibitory factor, monocyte chemoattractant protein 1, C-reactive protein, and proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-18, and IL-6 (15). We also have data regarding the enhanced pro-oxidant status of plasma from our cohort of patients with obesity (manuscript under preparation). All these factors contribute to the development of a systemic low-grade inflammation that has negative effects on tissues. In this regard, changes in one tissue might have a negative impact in several others (22). Successful experimental manipulations at the organ-specific (23) or systemic (22) level have proven to be promising and emphasize the systemic contagious aging effect.

As an initial step toward repair, cells respond to DNA damage by activating the DDR that can induce repair or trigger apoptosis or senescence via different signaling pathways (24). A common pathway involves recruitment and phosphorylation of histone H2AX at serine 139 (pS139). Although DDR foci detection by γ H2AX phosphorylation might generally be accepted as a marker of DNA breaks, it should be noted that γ H2AX presence should be interpreted as a readout of DDR and not as physical DNA damage. Therefore, a cell can experience DNA damage, even in the absence of detectable DDR foci, if upstream DDR signaling pathways are impaired (25). In this way, in the absence of γ H2AX, initial recruitment of ATM might be unaffected, but the formation of DDR foci might be disrupted (25).

Proper signaling of γ H2AX functions as an anticancer barrier and delays certain types of cancer by induction of cell death or senescence. Efficient DNA repair is essential for cell survival, and accumulation of defective repair machinery is an attribute of aging (26). Previous work has shown that PBMC from children with obesity were characterized by augmented γ H2AX. However, in the context of inflammation, improper DNA repair was associated with formation of micronuclei, which might be regarded as a risk factor for cancer (12). In our settings, the harmful environment present on plasma from individuals with obesity blunted γ H2AX signaling and impaired cellular resilience in lymphocytes and monocytes.

In agreement with reduced γ H2AX signaling, p53 phosphorylation was also reduced. The requirement of p53 for cell cycle arrest induction is a well-established mechanism that acts in coordination with the cell cycle regulator p21 (27). The oxidative state present in adipose tissue is a trigger for DNA damage and, consequently, p53 activation. However, a recent study based on experimental evidence explored a simple network and suggested that p53 level of activation mediated by p38 MAPK can modulate cells' fate into apoptosis or

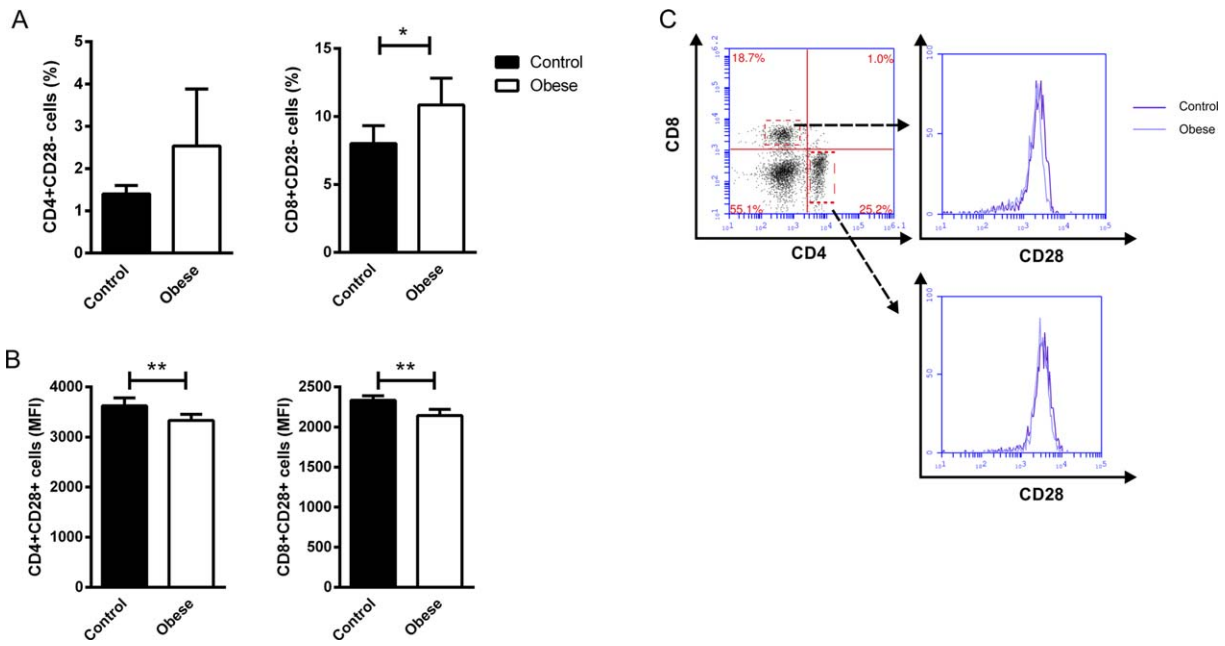


Figure 4 Immunosenescent phenotype of intact PBMC triggered by plasma from individuals with obesity. (A) Plots show CD8+CD28- immunosenescent cell population increase in PBMC cultured for 120 hours after 4 hours of exposure to plasma from individuals with obesity. (B) Plots show reduced expression of CD28 on surface of CD8+CD28+ and CD4+CD28+ T lymphocytes in PBMC cultured for 120 hours after 4 hours of exposure to plasma from individuals with obesity. (C) Representative flow cytometry dot plots and histogram analyses in CD4 and CD8 lymphocytes. Data presented as mean \pm standard deviation. Student *t* test performed, and significant differences were considered when $P < 0.05$ (*) and when $P < 0.01$ (**). MFI: median fluorescence intensity. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

senescence through the upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a} (28). Although we did not measure p16^{INK4a}, we might speculate that the reduced p53 phosphorylation in our study could be a consequence of an early event of cellular senescence induced by the acute inflammatory stimuli. Another possible explanation for decreased p53 activation associated with augmented early apoptosis is a p53-independent mechanism (29).

In addition to apoptosis, after 5 days of culture, we observed an induction of a premature immunosenescent mechanism in T lymphocytes. Major changes on senescent CD8⁺ and CD4⁺ cells is the reduction of CD28 expression on the cell's surface (30). Corroborating with a senescent status, loss of CD28 is accompanied by shorter telomeres, decreased telomerase activity (31), and upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{CIP1/WAF1} and p16^{INK4a} (32). In this work, we were not able to measure universal hallmarks of cell senescence such as p21 and p16 expression and β -galactosidase activity. However, presence of signs of aberrant DNA damage response and SASP in PBMC exposed to plasma from individuals with obesity are also predictors of senescence induction. Immunosenescence affects functions of regulatory systems through an increased oxidative and inflammatory stress, resulting in age dysfunction and increased morbidity and mortality (11,15). Obesity is associated with an altered immune defense having a reduced response to pathogens and vaccines (33,34), while calorie restriction is able to decrease cell senescence and increase life expectancy and longevity (35).

Mitochondrial dysfunction has also been characterized as a hallmark of aging (36). Studies have demonstrated the importance of

mitochondrial dysfunction and decreased ATP levels in senescence (9,10). Increased adenosine diphosphate/ATP ratios activate AMPK, which in turn can induce apoptosis or senescence through p53 or p16^{INK4a} pathways (9). In addition, genetic manipulations that impair mitochondrial function without increase of ROS production accelerates aging, suggesting that dysfunctional mitochondria *per se* can contribute to aging independently of ROS (37). Furthermore, obesity is a pathological condition associated with reduced expression of mitochondrial DNA and decreased levels of proteins involved in oxidative phosphorylation in several tissues (15).

Plasma from individuals with obesity modulated PBMC into an inflammatory profile, as evidenced by macrophage activation and increased secretion of inflammatory cytokines. The adipokine leptin is increased in the circulation of individuals with obesity and is implicated in the regulation of monocyte and lymphocyte function (38), associated with production of TNF- α , IL-6, nitric oxide synthase 2, and ROS. NF- κ B-driven inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 contribute to a positive cycle that supports and stabilizes stress-induced senescence. Circulating proinflammatory cytokines are strong predictors of age-related morbidity and mortality (11). Furthermore, hypertrophied adipocytes release saturated fatty acids that serve as ligands for Toll-like receptor 4 (TLR4), thereby inducing inflammatory changes in macrophages through NF- κ B activation (15).

At a cellular level, inflammation contributes to aging and decreases the regenerative potential of tissues. Proinflammatory signaling is integrated with stress and nutrient pathways such as p38 MAPK, TGF- β , and mTOR, which are involved in controlling mitochondrial

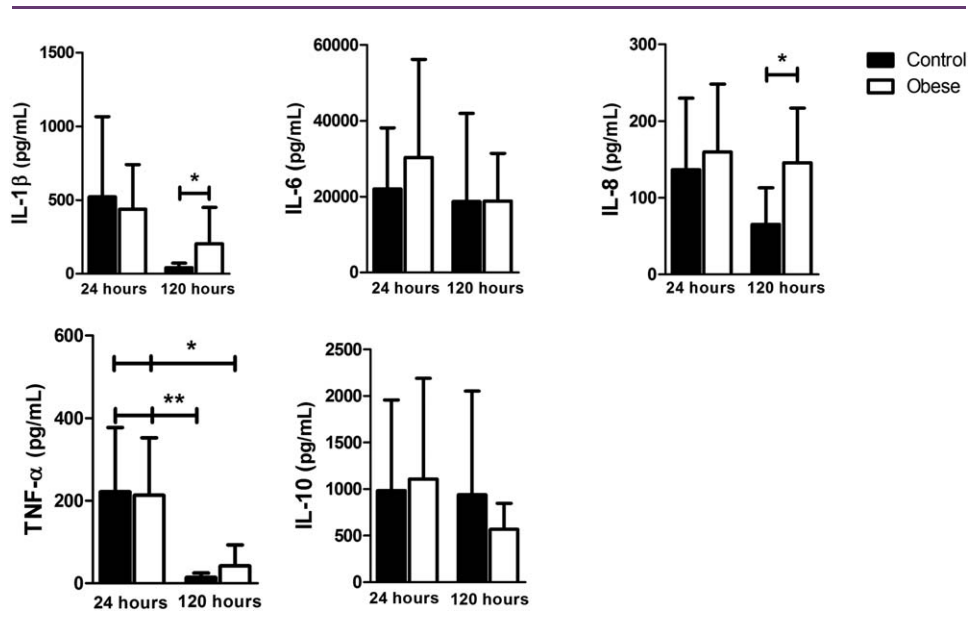


Figure 5 Enhanced cytokine secretion by PBMC exposed to plasma from individuals with obesity. (A) Plots show significant increase of IL-8 and IL-1 β secretion by PBMC cultured for 120 hours after 4 hours of exposure to plasma from individuals with obesity. Data presented as mean \pm standard deviation. Student *t* test or Mann-Whitney U-test performed when appropriate, and significant differences considered when $P < 0.05$ (*) and when $P < 0.01$ (**).

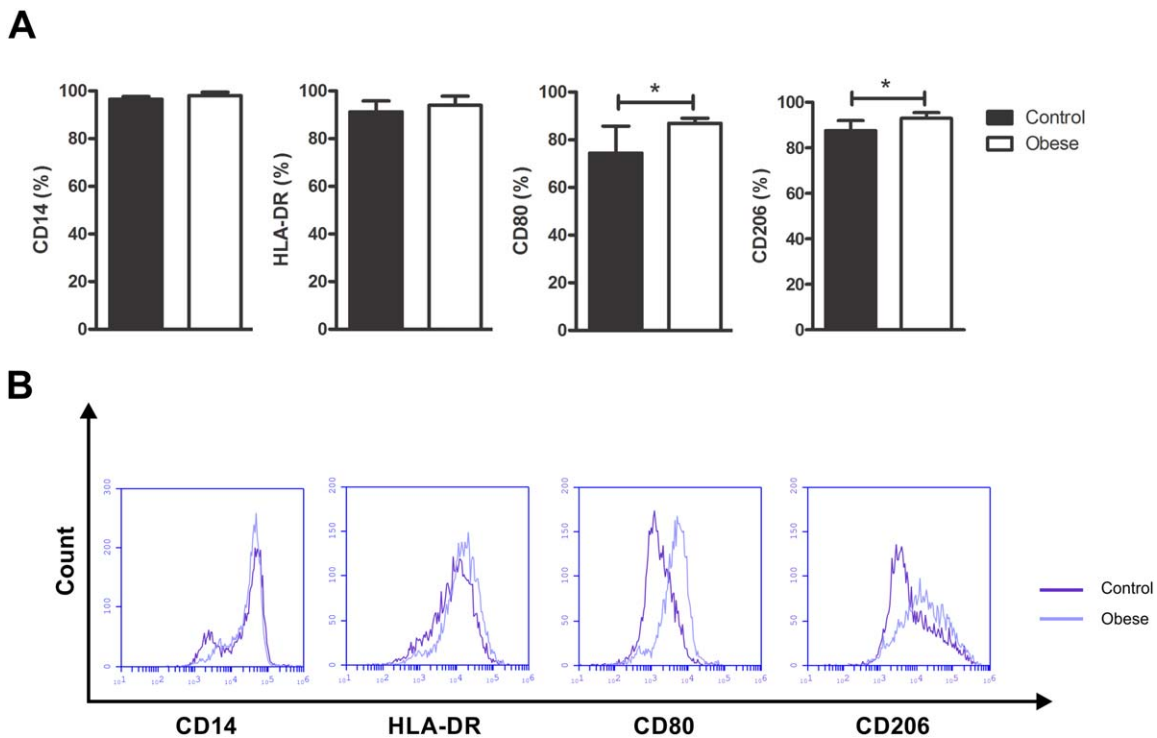


Figure 6 Monocyte to macrophage differentiation and subsequent activation triggered by acute stimuli from plasma from individuals with obesity. (A) Plots show significant increased surface expression of CD80 and CD206 markers in CD14⁺ gated cells from PBMC cultured for 120 hours after initial 4-hour exposure to plasma from individuals with obesity. (B) Representative histograms of surface expression of CD14, HLA-DR, CD80, and CD206 markers in CD14⁺ gated cells. Data presented as mean \pm standard deviation. Student *t* test performed, and significant differences considered when $P < 0.05$ (*). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

function and the production of free radicals (39). Thus, inflammatory mediators may be endogenous stressors of mitochondria and induce senescence and cell death (40). Premature accumulation of senescent cells enhances the oxidative and inflammatory signaling that induces DNA damage and mitochondrial dysfunction in a paracrine manner in surrounding cells in different tissues, creating a vicious cycle (8). In this context, our data support a causal role for chronic inflammation in obesity as a trigger of a pathological premature systemic aging phenotype.

A major limitation concerning our study was the reduced sample size. As expected, individuals with obesity presented important confounders such as comorbidities (systemic hypertension, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, dyslipidemia, and hepatic steatosis), all of them contributing to inflammation and oxidative imbalance. Also, valuable information regarding diet, latent or active viral infections, years of disease, and medication was missing and prevented us from exploring subgroup analyses to suggest further associations. Additional studies should be planned to determine the effect of plasma from healthy patients with obesity versus patients with obesity-related metabolic diseases.

Conclusion

Here we have presented data confirming the pathological consequences of plasma from patients with obesity. We have demonstrated a susceptibility for death and deterioration aggravated by the immunosenescent phenotype of lymphocytes induced by an acute stimulus. Our study emphasizes the need for further work exploring additional cellular and molecular mechanisms for the understanding of the aged phenotype observed in patients with obesity and aged-related diseases. **O**

© 2017 The Obesity Society

References

- Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015;14:644-658.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 2015;21:1424-1435.
- Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res* 2012;111:97-109.
- Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science* 2006;311:1257. doi:10.1126/science.1122446
- Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 2005;48:58-67.
- Minamoto T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:15-26.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-254.
- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013;15:978-990.
- Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab* 2016;23:303-314.
- Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, et al. Mitochondria are required for pro-aging features of the senescent phenotype. *EMBO J* 2016;35:724-742.
- Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69 (Suppl 1):S4-S9.
- Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J* 2011;25:685-693.
- Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, et al. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23:2165-2174.
- Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, et al. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal* 2009;2:ra11. doi:10.1126/scisignal.2000143
- De La Fuente M, De Castro NM. Obesity as a model of premature immunosenescence. *Curr Immunol Rev* 2012;8:63-75.
- Hirsch GE, Parisi MM, Martins LA, Andrade CM, Barbe-Tuana FM, Guma FT. gamma-Oryzanol reduces caveolin-1 and PCGEM1 expression, markers of aggressiveness in prostate cancer cell lines. *Prostate* 2015;75:783-797.
- Kelly AS, Ryder JR, Marlatt KL, Rudser KD, Jenkins T, Inge TH. Changes in inflammation, oxidative stress and adipokines following bariatric surgery among adolescents with severe obesity. *Int J Obes (Lond)* 2016;40:275-280.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347-2355.
- Zheng C, Yang Q, Cao J, et al. Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death Dis* 2016;7:e2167. doi:10.1038/cddis.2016.54
- Burgers AM, Biermasz NR, Schoones JW, et al. Meta-analysis and dose-response metaregression: circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2912-2920.
- Teumer A, Qi Q, Nethander M, et al. Genomewide meta-analysis identifies loci associated with IGF-I and IGFBP-3 levels with impact on age-related traits. *Aging Cell* 2016;15:811-824.
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011;477:90-94.
- Lavasani M, Robinson AR, Lu A, et al. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun* 2012;3:608. doi:10.1038/ncomms1611
- Mombach JC, Vendrusculo B, Bugs CA. A model for p38MAPK-induced astrocyte senescence. *PLoS One* 2015;10:e0125217. doi:10.1371/journal.pone.0125217
- d'Adda di Fagnana F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:512-522.
- Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* 2012;920:613-626.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:402-412.
- de Oliveira LR, Mombach JC, Castellani G. A simple stochastic model for the feedback circuit between p16INK4a and p53 mediated by p38MAPK: implications for senescence and apoptosis. *Mol Biosyst* 2015;11:2955-2963.
- Wang Y, Wang X, Flores ER, Yu J, Chang S. Dysfunctional telomeres induce p53-dependent and independent apoptosis to compromise cellular proliferation and inhibit tumor formation. *Aging Cell* 2016;15:646-660.
- Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des* 2013;19:1680-1698.
- Valenzuela HF, Effros RB. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol* 2002;105:117-125.
- Scheuring UJ, Sabzevari H, Theofilopoulos AN. Proliferative arrest and cell cycle regulation in CD8(+)CD28(-) versus CD8(+)CD28(+) T cells. *Hum Immunol* 2002;63:1000-1009.
- Huttunen R, Syrjanen J. Obesity and the risk and outcome of infection. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:333-340.
- Sheridan PA, Paich HA, Handy J, et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:1072-1077.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010;328:321-326.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153:1194-1217.
- Edgar D, Trifunovic A. The mtDNA mutator mouse: Dissecting mitochondrial involvement in aging. *Aging (Albany NY)* 2009;1:1028-1032.
- O'Rourke RW, Kay T, Lyle EA, et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol* 2006;146:39-46.
- Jurk D, Wilson C, Passos JF, et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun* 2014;2:4172. doi:10.1038/ncomms5172
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, et al. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 2003;107:1418-1423.

II.2 Plasma de indivíduos portadores de obesidade ativa macrófagos

II.2.1 Justificativa

Nossos dados prévios relacionados aos efeitos do plasma de indivíduos portadores de obesidade sobre PBMC saudáveis evidenciaram algumas perguntas: A imunossenescência observada nos linfócitos T CD8⁺ pode também ser induzida em células da imunidade inata, como macrófagos? O aumento da imunossenescência compromete a funcionalidade das células do sistema imune? Os efeitos observados são consequência da obesidade *per se* ou das comorbidades relacionadas a obesidade? Assim, com grande interesse em linhagens de monócitos/macrófagos, que atuam como células efetoras no processo inflamatório crônico da obesidade, utilizamos o modelo de macrófagos obtidos a partir da linhagem U-937 através da diferenciação com Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para responder estas perguntas. Estes macrófagos foram incubados por 4 horas com 10% de soro fetal bovino (SFB), plasma de indivíduos eutróficos, plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades ou plasma de indivíduos portadores de obesidade e síndrome metabólica (SM) afim de avaliar parâmetros relacionados a viabilidade, imunossenescência, funcionalidade e ativação celular.

II.2.2 Materiais e métodos

II.2.2.1 Sujeitos da pesquisa

Foram incluídos neste estudo sete indivíduos portadores de obesidade mórbida (índice de massa corporal, IMC $\geq 35,0$ kg/m²) sem comorbidades, sete indivíduos com obesidade mórbida (IMC $\geq 35,0$ kg/m²) e SM e sete controles eutróficos ($18,5$ kg/m² \geq IMC $\leq 24,9$ kg/m²). Os participantes portadores de obesidade foram recrutados no Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os controles eutróficos foram recrutados da comunidade. Foram incluídos apenas indivíduos maiores de dezoito anos que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este estudo foi conduzido de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e o *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaração de Helsink)*. Os Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS (Nº 760.537, anexo 1) e UFRGS (Nº 640.817, anexo 2) aprovaram o desenvolvimento deste trabalho.

II.2.2.2 Material Biológico e Cultura Celular

Dez mililitros de sangue venoso periférico foram coletados de cada indivíduo participante da pesquisa. O sangue coletado foi disposto em tubos contendo anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) e, posteriormente, centrifugado a 400xg por 15 minutos. O plasma foi removido e armazenado a -80 °C em alíquotas de 1.000, 500 e 70 μ L até o momento das análises.

As células da linhagem U-937 (*human histiocytic lymphoma*) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (www.bcrj.org.br) e mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Missouri, USA) suplementado com 10 % de SFB, 2 g/dL de tampão HEPES e 1 % de penicilina/estreptomicina (RPMI 10% SFB) e incubadas a 37 °C com 5 % CO₂. Para realização dos experimentos, as células U-937 foram diferenciadas a macrófagos com 10 nM de PMA em RPMI 10% SFB por 72 horas a 37 °C com 5 % CO₂ (Becker *et al.*, 2015). Após a diferenciação, os macrófagos foram divididos em 4 grupos e tratados por 4 horas com (1) RPMI suplementado com 10 % SFB, (2) RPMI suplementado com 10 % plasma de indivíduos eutróficos (controles), (3) RPMI suplementado com 10 % plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e (4) RPMI suplementado com 10 % plasma de indivíduos portadores de obesidade com SM. Após as 4 horas do tratamento, o meio de cultura foi trocado e os macrófagos foram mantidos em cultura com RPMI suplementado com 10% SFB até 24 ou 120 horas para realização dos ensaios (Figura 1).

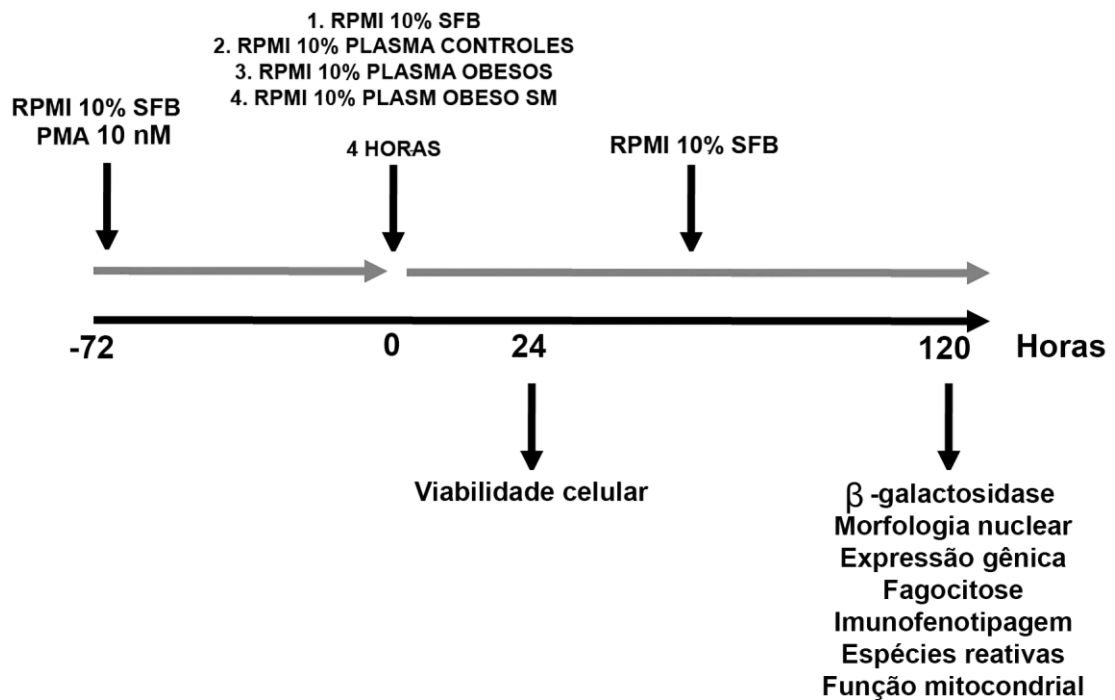


Figura 1. Fluxograma representativo da diferenciação e tratamento da cultura celular da linhagem U-937. SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino. PMA: Phorbol-12-miristato-13-acetato.

II.2.2.3 Ensaio de viabilidade celular

A atividade metabólica das oxirredutases celulares dependentes de NAD(P)H, como medida de viabilidade celular, foi avaliada pelo ensaio de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). Os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 24 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, incubados com 1 mg/mL de MTT (Sigma Aldrich, EUA) por 2 horas a 37 °C com 5 % CO₂. Após as duas horas, os cristais de formazam formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices, EUA) em placa de 96 poços no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

II.2.2.4 Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase

A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada pelo ensaio com o substrato C12FDG (5-dodecanoilaminofluoresceína di-p-D-galactopiranosídeo) (Sigma Aldrich, EUA), de acordo com Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009. O C12FDG é um composto não fluorescente permeável a membrana plasmática. Após entrar na célula, sofre hidrólise dos resíduos galactosil pela enzima β -galactosidase e emite fluorescência verde (515 nm), ficando restrito ao interior das células. Para a realização do ensaio, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, incubados com 100 nM de bafilomicina (Sigma Aldrich, EUA) por 1 hora, afim de inibir a acidificação lisossomal. Após 1 hora, foi adicionado ao meio de cultura o substrato C12FDG em uma concentração final de 33 μ M e os macrófagos foram incubados por mais duas horas em incubadora umidificada a 37 °C em 5 % de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e removidas da placa através de raspagem suave. A quantificação da emissão de fluorescência verde foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences, EUA) e as análises foram realizadas no software CellQuest Pro™ (BD Biosciences). Os dados foram expressos como porcentagem de células positivas para a atividade da enzima β -galactosidase.

II.2.2.5 Ensaio de morfometria nuclear (NMA)

A análise morfométrica nuclear se baseia em parâmetros de tamanho e regularidade do núcleo de células aderidas em cultura para avaliar a quantidade de células em uma população com características de senescência, apoptose ou irregularidade nuclear, os quais podem derivar de problemas durante a mitose. Nesse sentido, os núcleos celulares são classificados como normal (N), irregular (I), pequeno e regular (PR), pequeno (P), pequeno e irregular (PI), grande e regular (GR) e grande e irregular (I) gerando um valor de índice de irregularidade nuclear (NII) (Filippi-Chiela *et al*, 2012).

Para a realização do ensaio, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, lavados com PBS de forma que apenas as células aderidas pudessem ser avaliadas. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% (p/v em PBS), lavadas com tampão Tris-glicina 1X (0,025 M de Tris base e 0,192 M de Glicina) e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com Hoescht 33342 10 ug/mL (Thermo Fisher Scientific, EUA) por 10 minutos para marcação dos núcleos. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS, e, então, as lamínulas foram retiradas com auxílio de pinça e colocadas sobre uma lâmina contendo 10 µL de *Fluoromount* (Sigma-Aldrich), onde ficaram secando por 24 horas antes de observação no microscópio.

Cinquenta núcleos de cada cultura (controles n = 7, obesos n = 7 e obesos SM n = 7) foram fotografados em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 (filtro de excitação de 330 nm - 385 nm e filtro de emissão de 420 nm) e as medidas

dos parâmetros nucleares foram obtidas via *plug-in* no programa *ImageJ-Pro Plus* (National Institutes of Health, EUA). Os resultados de distribuição dos núcleos em quadrantes indicativos de senescência, apoptose ou irregularidades nucleares foram obtidos após análise em planilha do programa Excel para NMA disponibilizada na página do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do professor Guido Lenz, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LabSinal) (<<http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>>).

II.2.2.6 Expressão gênica de CDKN1A, CDKN2A e de GATA-4

A extração do RNA dos macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 e mantidos por mais 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB foi realizada com Trizol (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com 2 µg de RNA (pureza $\geq 1,7$), utilizando-se os iniciadores *random nonamers* (Sigma-Aldrich, EUA) e a enzima transcriptase reversa *M-MLV* (Sigma-Aldrich, EUA). Para as reações de PCR quantitativo (qPCR) em tempo real foram utilizados 2 uL de cDNA diluído na razão 1:20 com oligonucleotídeos iniciadores e sondas Taqman para os genes RPLPO, CDKN1A (p21) e CDKN2A (p16^{INK4}) (Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems, EUA). Todas as reações foram realizadas no equipamento *StepOnePlus® Real-Time PCR system* (Applied Biosystems)). Os resultados relativos de cada amostra foram calculados pelo método comparativo relativo $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001), normalizados pelo gene constitutivo (RPLP0, *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) e calibrados pela média do ΔCT do grupo.

II.2.2.7 Ensaio de fagocitose

A funcionalidade dos macrófagos foi avaliada através da capacidade fagocítica. Para isto, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, foram incubados com microesferas de poliestireno fluorescentes (*FluoSpheres® Fluorescent Microspheres*, Molecular Probes, EUA) na razão de 1:50 (microesferas/células) por 2 e 18 horas em incubadora umidificada a 37 °C em 5 % CO₂. Após 2 e 18 horas, os macrófagos foram gentilmente removidos da placa e a porcentagem de partículas fluorescentes internalizadas pelas células foi quantificada em citômetro FACSCalibur™ (BD Biosciences). A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa *CellQuest Pro™* (BD Biosciences). Os dados foram expressos pela porcentagem de células que realizaram fagocitose.

II.2.2.8 Imunofenotipagem

Para a análise de ativação e polarização, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB foram marcados com anticorpos anti-CD80-PE, anti-CD86-PerCP, anti-CD163-PE, anti-206-PeCY-5 (BD Biosciences).

Para o ensaio, as células foram bloqueadas em tampão de FACS (PBS suplementado com 0,5 % BSA) por 15 minutos e incubadas com os anticorpos apropriados (1:20) por 30 minutos no gelo e no escuro. As células foram lavadas e ressuspensas em 500 µL do tampão de FACS. A aquisição das amostras foi realizada

no aparelho BD Accuri C6™ (BD Biosciences). A compensação dos fluoróforos foi realizada com as mesmas populações celulares a serem analisados, com marcações únicas de cada fluoróforo. Foram adquiridos 10.000 eventos e a análise dos dados obtidos foi realizada através do programa BD Accuri C6™ (BD Biosciences). Os dados foram expressos por porcentagem de células positivas para cada marcador avaliado.

II.2.2.9 Ensaio de oxidação de DCF-DA

A produção intracelular de espécies reativas nos macrófagos foi analisada através do ensaio de *2'-7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína* (DCFH-DA). Este reagente é um composto naturalmente não fluorescente, porém de alta permeabilidade na membrana celular. Quando internalizado na célula, o DCFH-DA passa por reações de hidrólise e oxidação por esterases específicas e espécies reativas intracelulares, produzindo um composto polar, fluorescente e não permeável chamado de *2'-7'-diclorofluocisteína* (DCF). Para o ensaio, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por até 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, incubados por 30 minutos com 10 nM de DCFH-DA. Após estes 30 minutos, uma reação de leitura cinética foi programada em espectrofotômetro a 37 °C por uma hora (Spectra Max M5, Molecular Devices, EUA), onde a cada 10 minutos uma leitura de emissão de fluorescência foi realizada em comprimento de onda de excitação de 492 nm e de emissão de 514 nm. Os dados obtidos foram expressos por unidades arbitrárias por micrograma de proteína ($\mu\text{g/proteína}$), as quais foram dosadas pelo método de Lowry modificado de acordo com Peterson, 1979.

II.2.2.10 Ensaio de atividade e massa mitocondrial

A massa e atividade mitocondrial dos macrófagos foi avaliada através dos ensaios de *Mitotracker Green* (Life Technologies, EUA) e *Mitotracker Red* (Life Technologies), respectivamente. Para isto, os macrófagos tratados por 4 horas conforme a figura 1 foram mantidos por mais 120 horas em cultura com RPMI 10% SFB e, então, foram incubados com 100 nM de *Mitotracker Green* (Life Technologies) e *Mitotracker Red* (Life Technologies) por 30 minutos. Após a incubação, a leitura foi realizada em comprimento de onda de excitação de 490 nm e de emissão de 516 nm para *Mitotracker Green* e em comprimento de onda de excitação de 579 nm e de emissão de 599 nm para *Mitotracker Red* em Spectra Max M5 (Molecular Devices). Os dados obtidos foram expressos por unidades arbitrárias por micrograma de proteína ($\mu\text{g/proteína}$), as quais foram dosadas pelo método de Lowry modificado de acordo com Peterson, 1979.

II.2.2.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 6TM* (GraphPad Software Inc., versão 6.01). Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$ através de análise de ANOVA de uma via seguida de teste Tukey.

II.2.3 Resultados

Os dados demográficos dos indivíduos participantes deste estudo estão descritos na Tabela 1. Os controles eutróficos e os indivíduos portadores de obesidade possuem IMC estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$), mas são similares em relação a idade e ao sexo.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos eutróficos e dos indivíduos portadores de obesidade

	Controles eutróficos (n = 7)	Obesidade (n = 7)	Obesidade e SM (n = 7)	P*
Sexo, masculino (%)	2 (29)	2 (29)	2 (29)	n.s.
Idade, media \pm DP	36,7 \pm 8,5	35,8 \pm 10,9	37,8 \pm 6,65	n.s
IMC, media \pm DP	21,6 \pm 1,27	45,2 \pm 3,18	39,2 \pm 3,19	P < 0,0001
SM (%)	-	-	7 (100)	

IMC: Índice de Massa Corporal; DP: Desvio Padrão; SM: Síndrome Metabólica; n.s.: não significativo.
* diferenças estatísticas avaliadas por Teste Exato de Fischer ou Anova de uma via.

II.2.3.1 Diminuição da viabilidade e da massa mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade

Nossos dados prévios (capítulo I) mostram que o plasma de indivíduos portadores de obesidade é capaz de aumentar a morte celular por apoptose e induzir disfunção mitocondrial em PBMC. A partir destes resultados, nos perguntamos se o efeito de reduzir a viabilidade celular é da obesidade *per se* ou tem influência de comorbidades associadas a obesidade. Neste contexto, o plasma de indivíduos portadores de obesidade foi capaz de reduzir a viabilidade dos macrófagos diferenciados a partir de linhagem celular U-937 em comparação ao

controle de SFB após 24 horas de cultura, independente da presença de SM (Figura 2). Estes dados sugerem que indivíduos portadores de obesidade, mesmo na ausência de comorbidades, induzem alterações importantes no sistema imune que levam a morte prematura ou viabilidade celular reduzida.

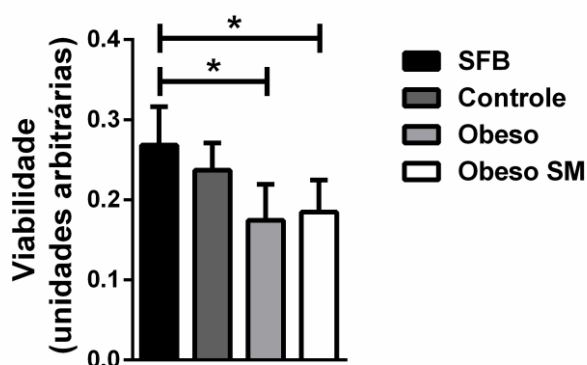


Figura 2. Viabilidade diminuída em macrófagos expostos ao plasma de indivíduos portadores de obesidade. Análise através do ensaio de MTT mostra redução da viabilidade dos macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade com SM em relação ao SFB após 120 horas de cultura. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. $P < 0,05$ (*). SM: síndrome metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino.

Além disso, nossos dados prévios (capítulo I) mostraram que após 4 horas de incubação de PBMC com plasma de indivíduos com obesidade houve redução no consumo de oxigênio basal e associado a produção de ATP, demonstrando disfunção mitocondrial nestas células através de respirometria de alta resolução. Neste contexto, avaliamos a situação da função mitocondrial dos macrófagos após 120 horas de cultura do insulto com plasma de indivíduos com obesidade (4horas). Surpreendentemente, os dados demonstraram que macrófagos incubados com plasma de indivíduos obesos com SM apresentaram reduzida massa mitocondrial (Figura 3A) e atividade mitocondrial (Figura 3B) em relação aos macrófagos

incubados com plasma de indivíduos controles e de indivíduos com obesidade sem comorbidades. No entanto, quando a razão da atividade mitocondrial (MTR) foi avaliada relativa a massa mitocondrial (MTG), não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 3C), mostrando que, apesar de possuírem menos massa mitocondrial, as mitocôndrias de macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com SM são funcionais após 120 horas.

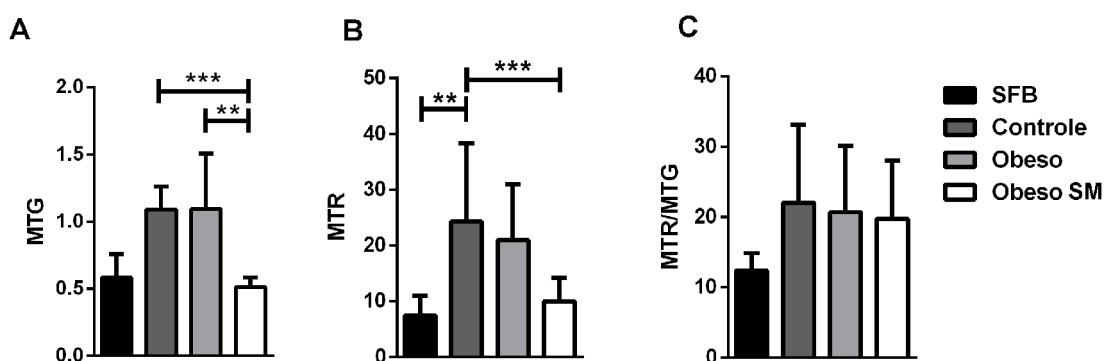


Figura 3. Diminuição da massa mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade e SM. (A) Análise através do ensaio de *Mitotracker Green* (MTG) mostra redução da massa mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com SM em relação aos controles e indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades após 120 horas de cultura. (B) Análise através do ensaio de *Mitotracker Red* (MTR) mostra redução do potencial de membrana mitocondrial em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com SM em relação aos controles após 120 horas de cultura. (C) A razão entre MTR e MTG mostra que não houve redução do potencial de membrana em relação a quantidade de mitocôndrias em nenhum dos grupos estudados. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,01 (**), P < 0,001 (***). SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino.

Finalmente, avaliamos a produção de espécies reativas pelos macrófagos. Entretanto, apesar de possuírem menos mitocôndrias e menor viabilidade celular, os macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e obesidade com SM apresentaram produção de espécies reativas similar aos tratados com SFB e aos controles (Figura 4).

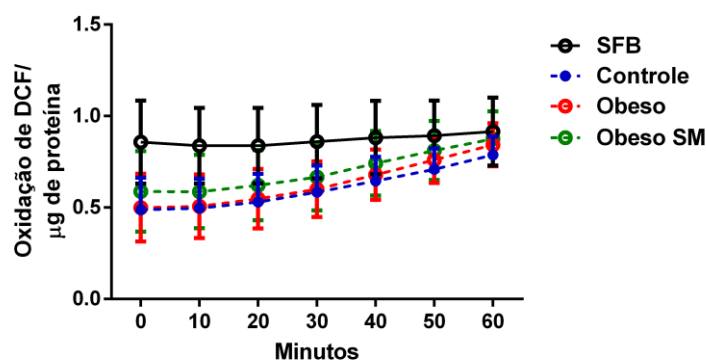


Figura 4. Níveis similares de oxidação de DCF-DA em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e portadores de obesidade com SM e indivíduos controles. Análise através do ensaio de DCF-DA mostra que não há diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos incubados com plasma de indivíduos dos três grupos em estudo após 120 horas de cultura. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino, DCF-DA: 2'-7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

II.2.3.2 Aumento de β -galactosidase em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade

Previamente foi demonstrado redução da viabilidade celular de macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade em 24 horas de cultura. Com intuito de investigar o destino das células resistentes a morte celular após as 24 horas, avaliamos a possível indução de senescência nos macrófagos que sobreviveram na cultura após 120 horas. Para isto, avaliamos a atividade da enzima β -galactosidase utilizando o substrato C12FDG. Neste contexto, o plasma de indivíduos eutróficos induziu porcentagem similar de atividade de β -galactosidase ao SFB, enquanto que o plasma de indivíduos portadores de obesidade, tanto na presença como na ausência de SM, induziu níveis significativamente maiores de expressão de β -galactosidase em relação aos indivíduos eutróficos e ao SFB (Figura 5A e 5B).

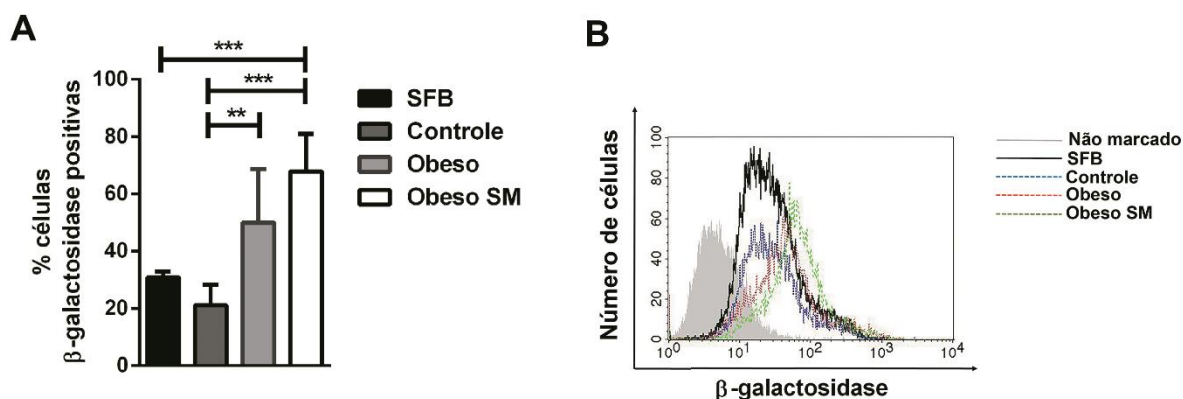


Figura 5. Aumento da atividade da enzima β -galactosidase em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise por citometria de fluxo com o substrato C12FDG mostra aumento da expressão da enzima β -galactosidase em macrófagos expostos ao plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos com obesidade e SM em comparação aos indivíduos controles após 120 horas de cultura. (B) Histogramas representativos da emissão de fluorescência verde pelas células positivas para β -galactosidase. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças significativas foram avaliadas por Anova de uma via seguida de Teste Tukey. $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino.

II.2.3.3 Morfologia nuclear não indica senescência em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade

Como a atividade de β -galactosidase a pH 6.0 pode ser induzida tanto por estímulos imunológicos como pelo estado senescente em macrófagos, utilizamos outra abordagem para confirmar o aumento de β -galactosidase como indicador de senescência nos macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade. Na análise da morfometria nuclear (NMA) avaliamos os núcleos de 50 células da cultura de macrófagos incubada com plasma de cada um dos indivíduos afim de compreender sua distribuição nos grupos definidos como: normal (N), irregular (I), apoptose (PR, P ou PI) ou senescência (GR e GI) geradas a partir da área e do índice de irregularidade nuclear (NII) dos núcleos das células. Os dados obtidos através do NMA indicam que macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades apresentam redução significativa nos

núcleos das células com morfologia correspondente ao fenótipo normal. No entanto, não houve diferença significativa entre a porcentagem de núcleos indicadores de senescência (grande e regular (GR) e grande e irregular (GI)) em macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles, de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e indivíduos portadores de obesidade e SM (Figura 6A, 6B, 6C). Estes dados sugerem que o aumento da atividade da enzima β -galactosidase nos macrófagos não foi acompanhado do aumento de morfologia nuclear compatível com senescência.

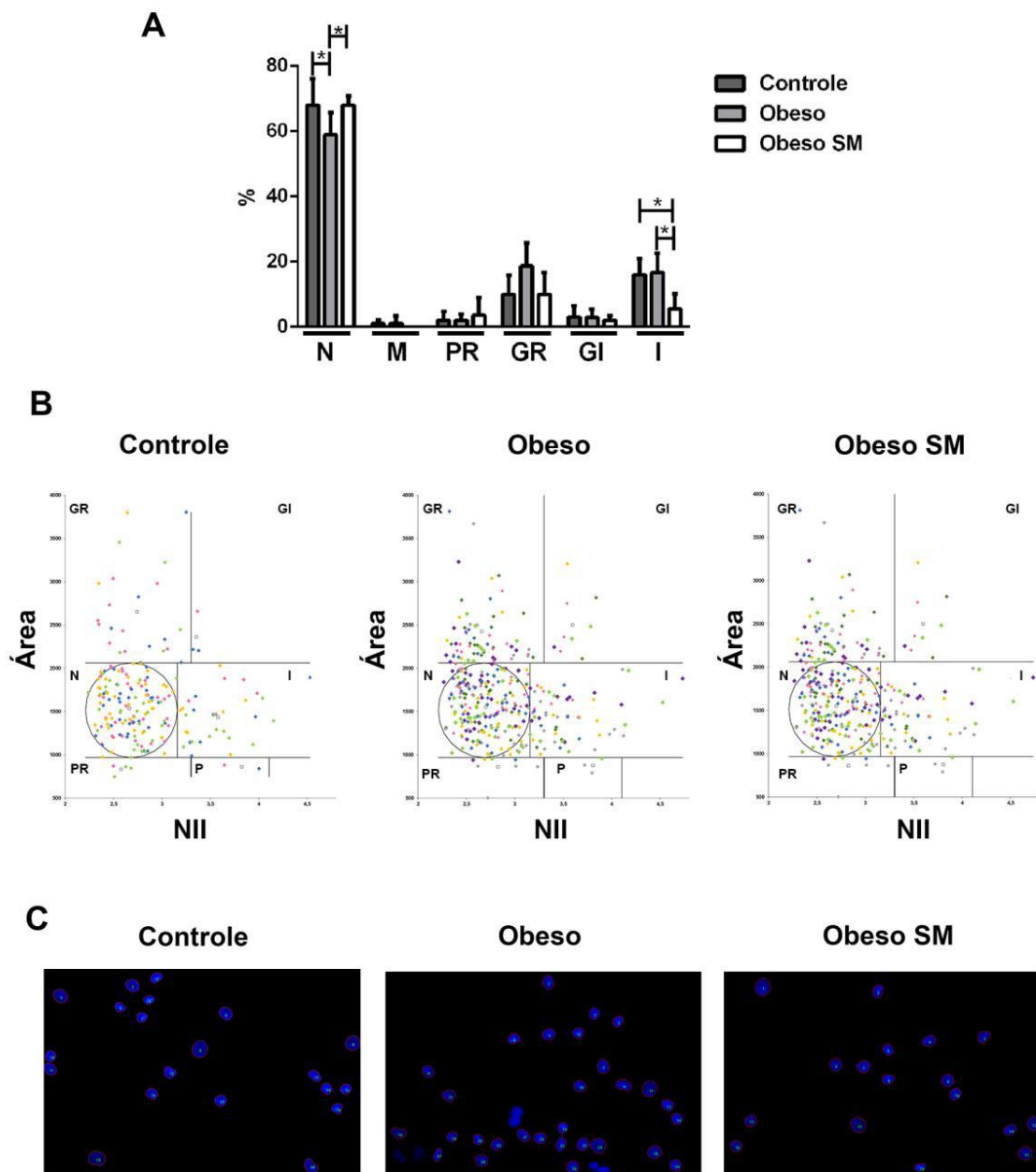


Figura 6. Morfologia nuclear não indica senescência em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade. (A) Análise por NMA mostra que não houve diferença significativa na morfologia nuclear compatível com senescência (GR e GI) nos macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles, de indivíduos com obesidade sem comorbidades e de indivíduos com obesidade e SM após 120 horas de cultura. (B) Gráfico de pontos que denota a distribuição dos 50 núcleos analisados de cada cultura de macrófagos tratados com o plasma de indivíduos de cada grupo em estudo. A cor de cada ponto representa os núcleos de cada indivíduo participante. Os quadrantes dos gráficos representam: N: normal; M: mitose; PR: pequeno e regular; GR: grande e regular; GI: Grande e Irregular; I: irregular (C) Imagem de microscopia de fluorescência representativa da cultura de macrófagos de cada um dos grupos analisados, marcação com Hoescht. Aumento original: 400x. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. $P < 0,001$ (***) , $P < 0,05$ (*), SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino, NII: Índice de Irregularidade Nuclear.

II.2.3.3 Expressão gênica de CDKN1A e CDKN2A similar em macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles e de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade com SM.

Como medida adicional de senescência, avaliamos a expressão gênica dos genes relacionados com a parada do ciclo celular CDKN1A e CDKN2A e também de GATA4. Não foi constatada expressão gênica de GATA4. Foi constatada expressão gênica similar em macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles, de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade e SM (Figura 7). Estes dados estão de acordo com o resultado obtido na análise da morfologia nuclear e suportam a ideia de que não ocorreu senescência nos macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade.

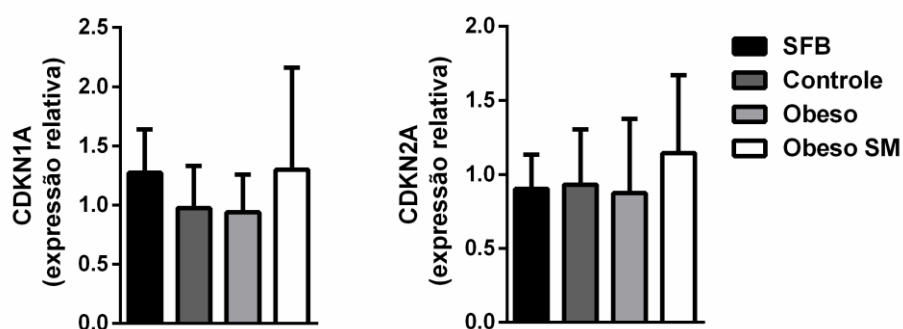


Figura 7. Níveis similares de expressão gênica de CDKN1A e CDKN2A em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade com o sem SM e indivíduos eutróficos. Análise através de PCR em tempo real mostra níveis similares de expressão gênica de CDKN1A e CDKN2A em macrófagos expostos ao plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades ou com SM e controles após 120 horas de cultura. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA.

II.2.3.3 Níveis aumentados de fagocitose em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade e de indivíduos eutróficos

Como medida complementar de indução de senescência ou ativação nos macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade, avaliamos a funcionalidade destas células através de ensaio de fagocitose. Neste contexto, macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade, independente da presença de SM, mostraram atividade fagocítica aumentada em relação aos macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles ou com SFB (Figura 8A e 8B). Estes dados mostram que mesmo com aumento de β -galactosidase, os macrófagos não diminuíram sua função.

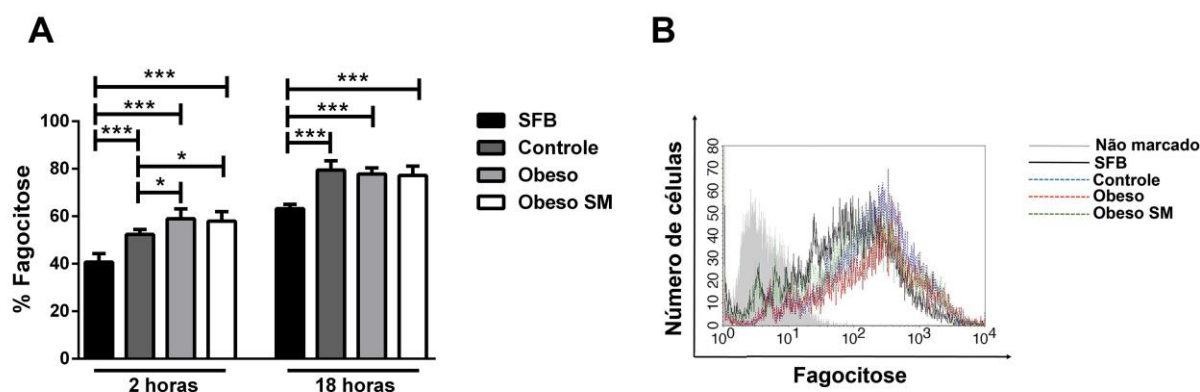


Figura 8. Atividade fagocítica de macrófagos incubados com plasma de indivíduos eutróficos e de indivíduos com obesidade. (A) Atividade fagocítica após 2 horas de internalização de partículas fluorescentes aumentada em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade sem comorbidades e de indivíduos com obesidade e SM após 120 horas de cultura. (B) Histogramas representativos da emissão de fluorescência vermelha pelos macrófagos incubados com plasma dos indivíduos dos grupos em estudo após 18 horas de internalização de partículas fluorescentes. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por Anova de uma via seguida de Teste Tukey. $P < 0,001$ (***) , $P < 0,05$ (*), SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino.

II.2.3.4 Expressão de marcadores de polarização

Como nossos dados tem sugerido a ativação de macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade, avaliamos a polarização destes macrófagos nos perfis inflamatório CD80 (molécula coestimulatória B7.1) e CD86 (molécula coestimulatória B7.2) ou regulador através dos marcadores de membrana CD206 (receptor de manose de macrófagos) e CD163 (receptor de sequestro haptoglobina-hemoglobina). Nossos dados mostram que os macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade e SM sofrem uma modulação positiva dos marcadores CD86, CD206 e CD163 (Figura 9A e B).

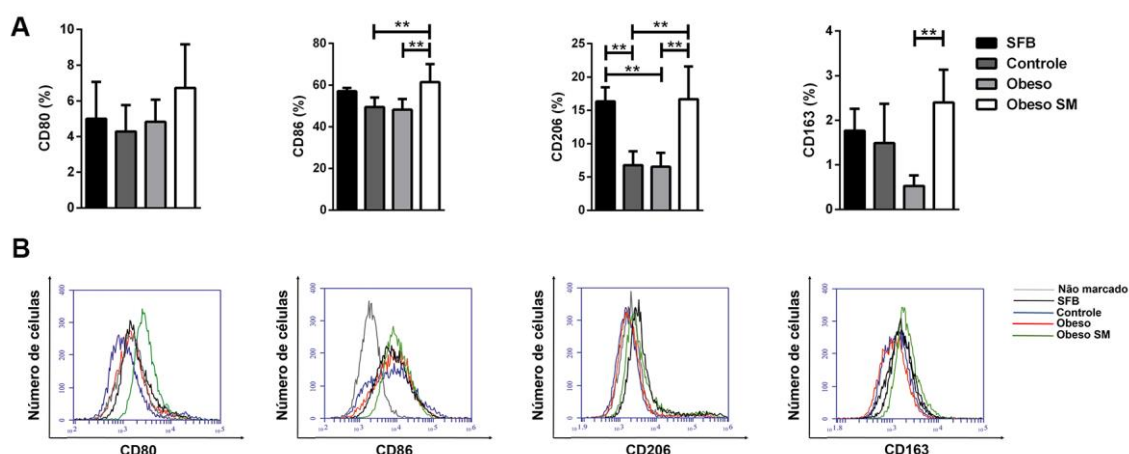


Figura 9. Aumento da expressão proteica dos marcadores de polarização CD86, CD206 e CD163 em macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade e SM. (A) Ensaio de imunofenotipagem mostra modulação positiva dos marcadores CD86, CD206 e CD163 em macrófagos incubados com plasma de indivíduos com obesidade e SM após 120 horas de cultura. (B) Histogramas representativos da expressão dos marcadores CD80 (molécula coestimulatória B7.1), CD86 (molécula coestimulatória B7.2), CD206 (receptor de manose de macrófagos) e CD163 (receptor de sequestro haptoglobina-hemoglobina) pelos macrófagos incubados com plasma de indivíduos dos diferentes grupos em estudo após 120 horas de cultura. SFB n=3, controle n=7, obeso n=7 e obeso SM n=7. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,001 (***), P < 0,01 (**), SM: Síndrome Metabólica, SFB: Soro Fetal Bovino.

II.2.4 Conclusões parciais

1. O insulto por 4 horas com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade e SM reduziu a viabilidade de macrófagos após 24 horas de cultura, mostrando o papel citotóxico da obesidade sobre macrófagos, independente da presença de comorbidades;
2. O insulto por 4 horas com plasma de indivíduos com obesidade e SM reduziu a massa mitocondrial de macrófagos após 120 horas de cultura, mostrando o papel das comorbidades da obesidade sobre o metabolismo mitocondrial;
3. O insulto por 4 horas com plasma de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e de indivíduos portadores de obesidade e SM aumentou a atividade da enzima β -galactosidase a pH 6.0 em macrófagos resistentes a morte celular após 120 horas de cultura;
4. Não houve diferença na morfologia nuclear associada a senescência e na expressão dos genes CDKN1A e CDKN2A entre macrófagos incubados com plasma de indivíduos controles e de indivíduos portadores de obesidade sem comorbidades e com SM;
5. O plasma de indivíduos portadores de obesidade, independente da presença de comorbidades, induziu aumento de atividade fagocítica nos macrófagos. Porém, apenas o plasma de indivíduos portadores de obesidade e SM induziu aumento da expressão proteica dos marcadores de polarização inflamatória (CD86) e reguladora (CD163 e CD206) nos macrófagos.

II.3 Instabilidade genômica e inflamação em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos portadores de obesidade

II.3.1 Justificativa

A obesidade compartilha algumas características com o envelhecimento, como uma inflamação sistêmica de baixo grau, estresse oxidativo, encurtamento de telômeros e senescência. Apesar das várias evidências de envelhecimento acelerado, o possível impacto da obesidade sobre a imunossenescência prematura e a instabilidade genômica tem sido pouco debatidos. Em nossos resultados prévios, demonstramos que a exposição aguda de PBMC saudáveis com plasma de indivíduos portadores de obesidade alterou a sinalização de DDR e induziu apoptose e imunossenescência nestas células. Assim, nesta abordagem, investigamos se as alterações encontradas em nosso modelo de cultura suplementado com plasma de indivíduos portadores de obesidade podem ser confirmadas nas PBMC extraídas diretamente dos indivíduos portadores de obesidade, com a finalidade de determinar marcadores de instabilidade genômica e inflamação.

II.3.2 Materiais e Métodos

II.3.2.1 Sujeitos da pesquisa

Foram incluídos neste estudo 11 indivíduos com obesidade mórbida ($IMC \geq 35,0 \text{ kg/m}^2$) e 15 controles eutróficos ($18,5 \text{ kg/m}^2 \geq IMC \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$). Todos os participantes portadores de obesidade foram recrutados no Centro de Obesidade e

Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS (Nº 760.537, anexo 1) e UFRGS (Nº 640.817, anexo 2). Os controles eutróficos foram recrutados da comunidade. Foram incluídos apenas indivíduos maiores de dezoito anos que leram e assinaram o TCLE. Este estudo foi conduzido de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e o *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)*.

II.3.2.2 Material Biológico e Cultura Celular

Foram coletados cinco mililitros de sangue venoso periférico de cada indivíduo participante da pesquisa. O sangue coletado foi disposto em tubos contendo anticoagulante EDTA e, posteriormente, as PBMC foram isoladas por gradiente de densidade (Histopaque 1,077 g/mL; Sigma Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As PBMC purificadas foram contadas em hemocítmetro com corante Azul de Tripán e utilizadas para os experimentos quando a viabilidade foi superior a 95 %.

Para os experimentos, as PBMC isoladas foram imediatamente utilizadas (*ex vivo*) ou foram cultivadas em placas de 6 ou 12 poços na concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (RPMI 10% FBS), 2 g/dL de tampão HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina, *phorbol myristate acetate* (PMA, 10 ng/mL, Sigma Aldrich) e ionomicina (IONO, 500 ng/mL, Sigma Aldrich) e incubadas a 37 °C com 5 % CO₂ por 2, 24 ou até 120 horas.

Alternativamente a coleta de PBMC, de uma segunda coorte de indivíduos portadores de obesidade foram coletadas células epiteliais da mucosa oral da parede interna da cavidade bucal através de um raspado com escova citológica (indivíduos com obesidade n=6, indivíduos controles eutróficos n=6). Antes da coleta do material, os participantes foram orientados a higienizar a boca com água e as amostras coletadas foram armazenadas a 4°C em metanol (Merck, EUA) com 5% de DMSO (Sigma Aldrich, EUA).

II.3.2.3 Análise de dano ao DNA e cinética de reparo de dano ao DNA

O dano basal ao DNA das PBMC (*ex vivo*) e a cinética de reparo de dano ao DNA foram realizados através de teste do cometa sob condições alcalinas, que detecta SSB e DSB. Para a realização deste ensaio, uma parte das PBMC foi utilizada para o ensaio imediatamente após o isolamento em gradiente de densidade (avaliação do dano ao DNA basal – *ex vivo*) e o restante foi incubado com 10 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 5 minutos no gelo. Estas PBMC foram, então, utilizadas para o ensaio da recuperação do tratamento com H₂O₂ (avaliação da cinética de reparo de dano ao DNA) após 60, 180 e 220 minutos.

Para a realização do ensaio, as células foram misturadas com 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,7 % em tampão fosfato) e adicionadas a lâminas de microscopia previamente tratadas com 1,5 % de solução de agarose. As lâminas foram incubadas com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 20 mM NaOH, pH 10,2, 1% Triton X-100 e 10 % DMSO) por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram removidas da solução de lise e submetidas a solução alcalina (200mM NaOH e 1mM de EDTA; pH >7) por 20 minutos para desnaturação seguidas de 15 minutos de eletroforese (25V, 300 mA). Após a

eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em solução de 0,4M Tris 0,4 M (pH 7,5) e lavadas com água. Após secagem, as lâminas foram fixadas e marcadas com 20 μ L DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Aldrich). Cada lâmina foi avaliada por microscopia de fluorescência e o grau de dano foi classificado visualmente. Um total de 100 núcleos foram avaliados por lâmina através de um escore de 0 a 4, dependendo do comprimento (fração) de DNA na cauda. A pontuação geral para cada lâmina foi, portanto, entre 0 (não danificado) e 400 (completamente danificado).

II.3.2.4 Ensaio de micronúcleos bucal (*Buccal Micronucleus Cytome (BM)Cyt assay*)

Para realização do ensaio, as células previamente fixadas em metanol na presença de 5 % de DMSO foram hidrolisadas em HCl e coradas pelo método de Feulgen e analisadas de acordo com Bolognesei (2013). Os critérios de pontuação para os diferentes tipos de células e anomalias nucleares no ensaio BM)Cyt são destinados a classificar as células epiteliais da mucosa bucal em categorias que as distinguem entre células "normais" (células basais) e células que são consideradas "anormais", com base em características citológicas e nucleares. Essas características são indicativas de dano do DNA (micronúcleos e pontes núcleo-plásmicas), de falência de citocinese (células binucleadas) ou morte celular (cromatina condensada, cariorrese, picnóse, cariólise). Foram examinadas duas mil células por amostra para determinar a frequência destes tipos celulares.

II.3.2.5 Detecção intracelular das fosfoproteínas γ H2AFX, TP53, pERK1/2 e p65 do NF κ B

Os níveis de fosforilação de γ H2AFX, TP53, pERK1/2 e p65 (NF κ B) foram avaliados em PBMC *ex vivo* (sem estímulo) e em PBMC cultivadas durante 2 horas com estímulos mitogênicos (PMA+IONO). Primeiramente, as células foram fixadas e permeabilizadas com tampão Perm/Fix Buffer (BD Biosciences, EUA) por 40 minutos a 4 °C. As células foram então lavadas duas vezes com tampão Perm/Wash buffer (BD Biosciences) e ressuspensas em 100 μ L de tampão Perm/Wash (BD Biosciences) com os seguintes anticorpos: anti-fosfo-H2AFX (pS139, clone N1-431, 1:5) conjugado com Alexa Fluor® 488 (BD Biosciences) e anti-fosfo-p53 (pS37, clone J159-641,79, 1:20) conjugado com Alexa Fluor® 647 (BD Biosciences) ou anti-fosfo-NF κ B p65 (pS529, clone K10-895.12.50, 1:5) conjugado com Alexa Fluor® 488 (BD Biosciences) e anti-fosfo-ERK1/2 (pT202/pY204, clone 20A, 1;20) conjugado com PE (BD Biosciences) e foram incubadas por 60 minutos a 4°C. Finalmente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão Perm/Wash (BD Biosciences). Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Os dados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

II.3.2.6 Ensaio de viabilidade celular

Eventos de apoptose e a necrose das PBMC *ex vivo* foram analisados através da marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo (BD Biosciences). Para isto, as células foram ressuspensas em uma concentração final de 5×10^5 células em 100 μ L de tampão de ligação (10 mM de HEPES / NaOH, pH 7,4, 140 mM de

NaCl, 2,5 mM de CaCl₂) e incubadas com 3 µL de Anexina-V durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Antes da aquisição, o iodeto de propídeo foi adicionado a uma concentração final de 1 mg/mL. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Os dados foram expressos como porcentagem de células.

II.3.2.7 Extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo Real

A extração de RNA total das PBMC *ex vivo* e cultivadas com PMA+IONO por 120 horas foi realizada com Reagente Trizol (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi executada com 1,2 µg de RNA utilizando-se os iniciadores *random nonamers* (Sigma-Aldrich) e a enzima transcriptase reversa do vírus *M-MLV* (Sigma-Aldrich). Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 2 uL de cDNA diluído na razão 1:20 para reações com primers e sondas para os genes RPLP0, CDKN1A (p21) e p16^{INK4} CDKN2A (p16)) (Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems, EUA). Todas as reações foram realizadas no equipamento *StepOnePlus® Real-Time PCR system* (Applied Biosystems). Os resultados relativos de cada amostra foram calculados pelo método de $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001), normalizados pelo gene constitutivo (RPLP0, *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) e calibrados pela média do ΔCT do grupo.

II.3.2.8 Quantificação da secreção de citocinas

A secreção de citocinas foi avaliada no meio de cultura das PBMC cultivadas por 24 e 120 horas na presença de PMA+IONO por citometria de fluxo (*Cytometry*

Bead Array (CBA)) com o *Kit Human Inflammatory Kit* (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Accuri C6™ (BD Biosciences) e analisadas com o programa *FCAP Array*™ v3.0.1 (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). Os resultados foram expressos em nanograma por miligrama de proteína por mililitro de meio de cultura (ng/mgproteína/mL). O limite de detecção das citocinas foi de 3,6 pg/mL para IL-8; 7,2 pg/mL para IL-1β; 2,5 pg/mL para IL-6; 3,3 pg/mL para IL-10; 3,7 pg/mL para TNF-α; 1,9 pg/mL para IL-12.

II.3.2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software *GraphPad Prism* 6™ (GraphPad Software Inc., versão 6.01). Quando apropriado, foram utilizados teste T, ANOVA de uma via ou teste de Kruskal-Wallis. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

II.3.3 Resultados

Os dados demográficos estão descritos na Tabela 1. Como esperado, os controles eutróficos e os indivíduos portadores de obesidade possuem IMC estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$), mas são similares em relação a idade e ao sexo.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos controles eutróficos e indivíduos portadores de obesidade

	Controles eutróficos (n = 15)	Indivíduos com obesidade (n = 11)	P*
Sexo, masculino (%)	2 (13,3)	2 (18,1)	n.s.
Idade, media ± DP	38,1 ± 7,8	41,2 ± 6,6	n.s.
IMC, media ± DP	21,9 ± 1,9	52,9 ± 6,7	<0,0001
Comorbidades (%)			
HS	-	8 (72,7)	
DM2	-	4 (36,3)	
SM	-	6 (54,5)	
DIS	-	6 (54,5)	
AS	-	5 (45,4)	

IMC: Índice de Massa Corporal; DP: Desvio Padrão; HS: Hipertensão Sistêmica; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2, SM: Síndrome Metabólica; DIS: dislipidemia; AS: apneia do sono; n.s.: não significativo. * diferenças estatísticas avaliadas pelo Teste T.

II.3.3.1 Instabilidade genômica em indivíduos portadores de obesidade

A obesidade é uma condição patológica associada ao envelhecimento prematuro. Como a instabilidade genômica é um fenômeno associado ao envelhecimento precoce e nossos dados preliminares mostraram que o plasma de indivíduos com obesidade é capaz de diminuir a fosforilação da H2AFX, importante proteína da DDR, avaliamos se as PBMC de indivíduos com obesidade apresentam DDR comprometida. Neste contexto, constatou-se que controles eutróficos e indivíduos portadores de obesidade possuem níveis similares de fosforilação da histona H2AFX nas PBMC circulantes. No entanto, quando estas células foram submetidas a um estímulo mitogênico, as PBMC de indivíduos portadores de obesidade apresentaram uma menor fosforilação de H2AFX, sugerindo uma sinalização de DDR comprometida e um fenótipo semelhante com aquele

demonstrado em nosso modelo *in vitro* quando incubadas com plasma (Figura 1A e 1B).

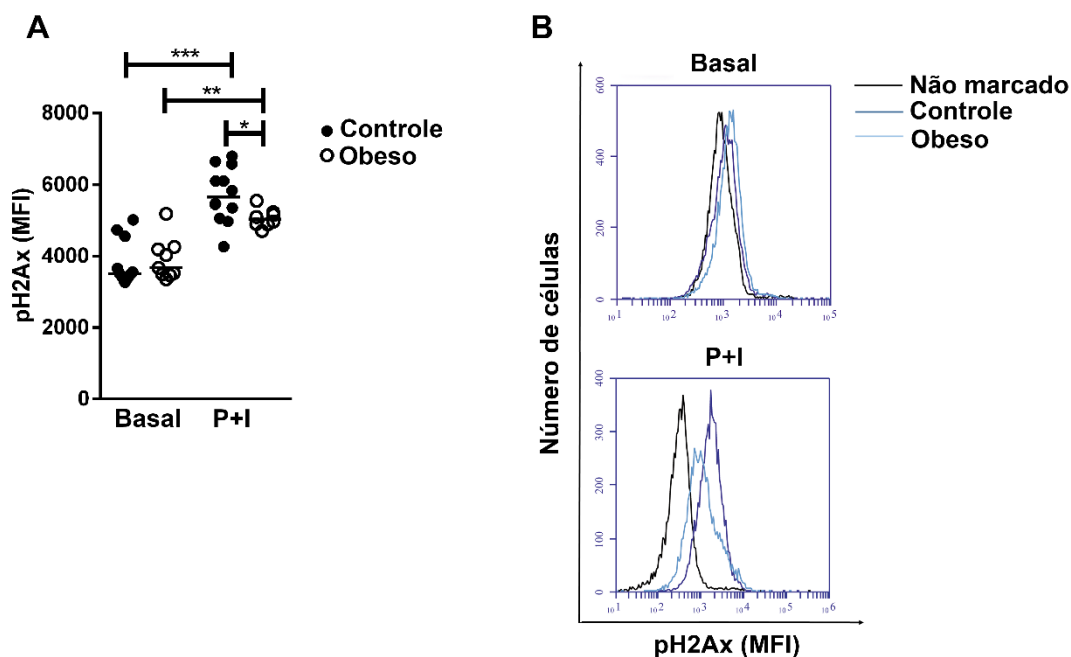


Figura 1. Sinalização da histona H2AFX comprometida em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise através da técnica de *Phosflow* mostra níveis similares de fosforilação de H2AFX (pS139) entre indivíduos com obesidade e indivíduos eutróficos (controles) em PBMC avaliadas imediatamente após o isolamento em gradiente de densidade (basal) e níveis significativamente diminuídos de fosforilação de H2Ax (pS139) nos indivíduos portadores de obesidade nas PBMC avaliadas duas horas após o estímulo mitogênico de 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). (B) Histogramas representativos da fosforilação de H2AFX (pS139) em indivíduos controles e portadores de obesidade, antes (basal) e após 2 horas de estímulo com 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). MFI: mediana de intensidade de fluorescência. Controle n= 15, obeso n=11. Os dados estão representados pela mediana. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***).

Para avaliar o impacto da menor fosforilação de H2AFX no dano ao DNA das PBMC dos indivíduos portadores de obesidade, foi realizado o ensaio de reparo de dano ao DNA através do teste do cometa. Assim, foi confirmado que indivíduos portadores de obesidade e controles eutróficos possuem níveis similares de dano ao DNA intrínseco nas PBMC circulantes (*ex vivo*). Por outro lado, as PBMC dos indivíduos portadores de obesidade mostraram uma eficiência de reparo de dano ao

DNA comprometida após 180 e 220 minutos de recuperação do insulto genotóxico com H₂O₂. Esses resultados sugerem uma DDR comprometida e associada com uma menor sinalização ou ativação de H2AFX (Figura 2A e 2B).

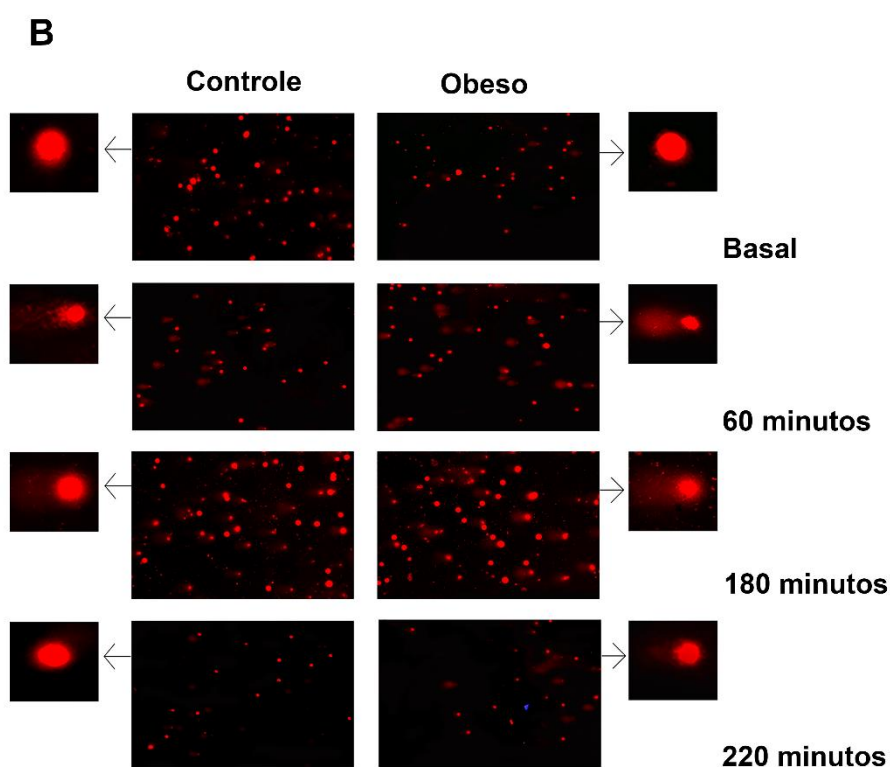
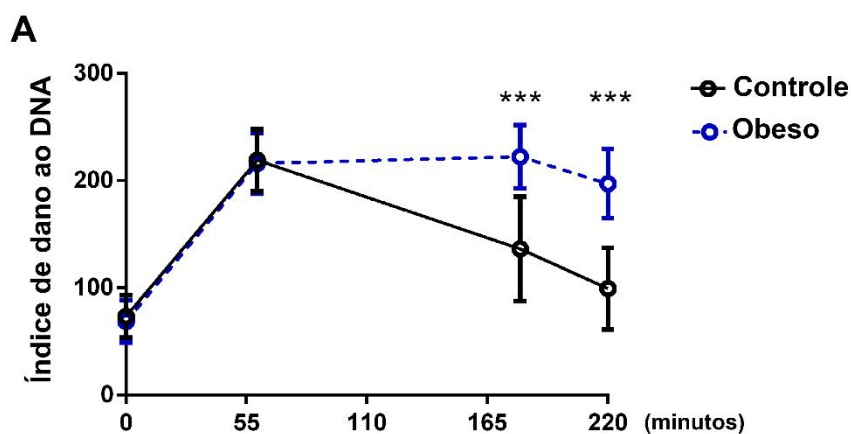


Figura 2. Cinética de reparo de dano ao DNA comprometida em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise através de ensaio do cometa mostra níveis basais semelhantes de dano ao DNA entre indivíduos portadores de obesidade e indivíduos eutróficos (controles). As PBMC foram avaliadas imediatamente após o isolamento (tempo 0 - basal). Entretanto, níveis significativamente aumentados de dano ao DNA nas PBMC de indivíduos portadores de obesidade são observados após 180 e 220 minutos de recuperação do insulto genotóxico de 10 minutos com 10 μ M de H₂O₂. (B) Imagens representativas da microscopia do ensaio do cometa antes (basal) e após o insulto genotóxico com 10 μ M de H₂O₂ (60, 180 e 220 minutos). Controle n= 15, obeso n=11. Aumento original 400x. Os dados estão representados pela média e desvio padrão. Diferenças estatísticas foram avaliadas por Anova de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,001 (***)

Finalmente, para confirmar que o menor reparo de dano ao DNA impacta em dano persistente ao DNA nos indivíduos portadores de obesidade, avaliamos a presença de marcadores de genotoxicidade, como a presença de micronúcleos e de pontes núcleo-plasmáticas em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos portadores de obesidade. Neste contexto, indivíduos portadores de obesidade apresentam maior frequência de micronúcleos (Figura 3). Juntos, a menor fosforilação de H2AFX, a cinética de reparo de dano ao DNA comprometida e o aumento na frequência de micronúcleos confirmam a obesidade como uma patologia relacionada a instabilidade genômica.

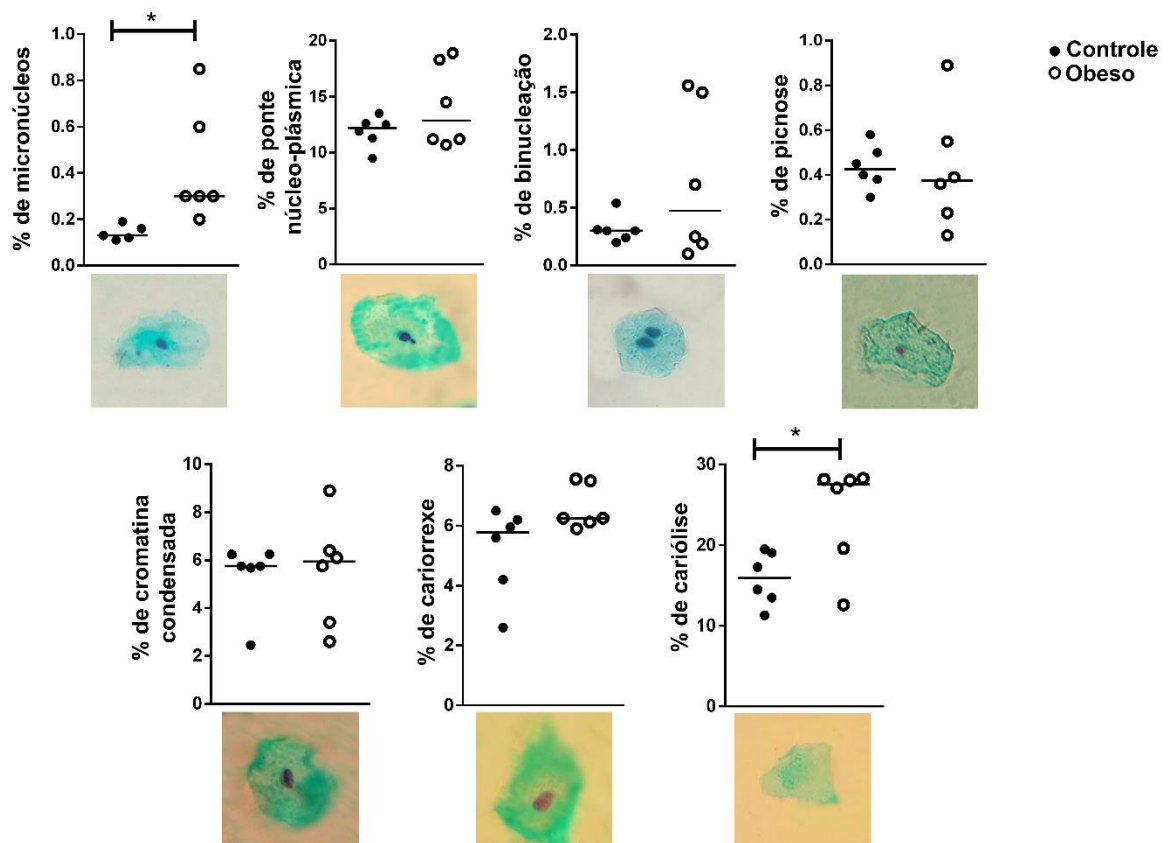


Figura 3. Aumento da frequência de micronúcleos e de cariólise nas células epiteliais da mucosa oral de indivíduos portadores de obesidade. Análise através de *Cytome Assay* mostra aumento na frequência de micronúcleos, marcadores de instabilidade genômica, e de cariólise, marcador de morte celular, em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos portadores de obesidade. Os gráficos estão acompanhados (quadro inferior) por uma micrografia representativa da condição avaliada. Aumento original 1000x. Controle n= 6, obeso n=6. A linha horizontal nos gráficos de ponto representa a medida de tendência central de mediana. Diferenças significativas foram avaliadas por Teste T. P < 0,05 (*).

II.3.3.2 Aumento de apoptose em PBMC de indivíduos com obesidade

O reparo de dano ao DNA comprometido em indivíduos com obesidade pode ser responsável pela indução de morte celular precoce ou senescência prematura. Para confirmar esta hipótese, avaliamos a ocorrência de apoptose e necrose nas PBMC circulantes. Foi possível constatar que PBMC de indivíduos com obesidade apresentam maior porcentagem de células em apoptose (Figura 4A e 4B). Além disso, o aumento de cariólise, marcador de morte celular, em células epiteliais da mucosa oral, confirma que a morte celular aumentada não é um fenômeno restrito ao sistema imune nos indivíduos com obesidade (Figura 4).

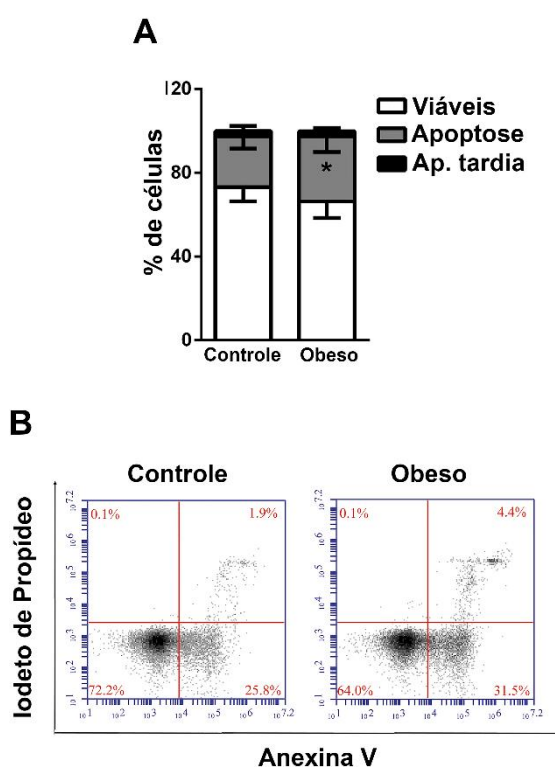


Figura 4. Aumento da morte celular por apoptose em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise através do ensaio de Anexina-V e iodeto de propídeo mostram aumento significativo na porcentagem de células em apoptose nas PBMC de indivíduos portadores de obesidade, quando avaliadas imediatamente após o isolamento (basal). Os dados estão representados pela média e desvio padrão. (B) *Dot Plot* representativos da marcação com Anexina-V e iodeto de propídeo em PBMC de indivíduos eutróficos (controle) e indivíduos portadores de obesidade (Obeso). Controle n= 15, obeso n=11. Diferenças significativas entre a porcentagem de células em apoptose de indivíduos com eutróficos (controles) e indivíduos com obesidade foram avaliadas por Teste T. P < 0,05 (*).

II.3.3.3 Sinalização da via TP53/CDKN1A comprometida em PBMC de indivíduos portadores de obesidade

Como alternativa a apoptose, as células podem responder ao dano persistente ao DNA com a indução de senescência. Neste contexto, avaliamos a via de sinalização TP53/CDKN1A (p53/p21) nas PBMC através da fosforilação de TP53 *ex vivo* e após 2 horas de estímulo mitogênico com PMA+IONO. Também avaliamos a expressão gênica de *CDKN1A* (p21) *ex vivo* e após 120 horas de estímulo mitogênico. Constatou-se que indivíduos portadores de obesidade não respondem com aumento da sinalização de p53 quando estimuladas com PMA+IONO, ao contrário do que acontece nos indivíduos controles (Figura 5A e 5B). Corroborando com estes resultados, após 120 horas de cultivo de PBMC com PMA+IONO, a expressão gênica de *CDKN1A* está diminuída em indivíduos portadores de obesidade em relação aos controles eutróficos. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a via de sinalização TP53/CDKN1A não é ativada em indivíduos com obesidade para indução de senescência (Figura 5C). Além disso, não detectamos expressão gênica de *CDKN2A* (p16) nas PBMC *ex vivo* de indivíduos eutróficos e de indivíduos com obesidade. Entretanto, após 120 horas de incubação com PMA+IONO, houve uma regulação positiva na expressão deste gene, embora a diferença não tenha sido significativa entre os dois grupos em estudo (Figura 5D).

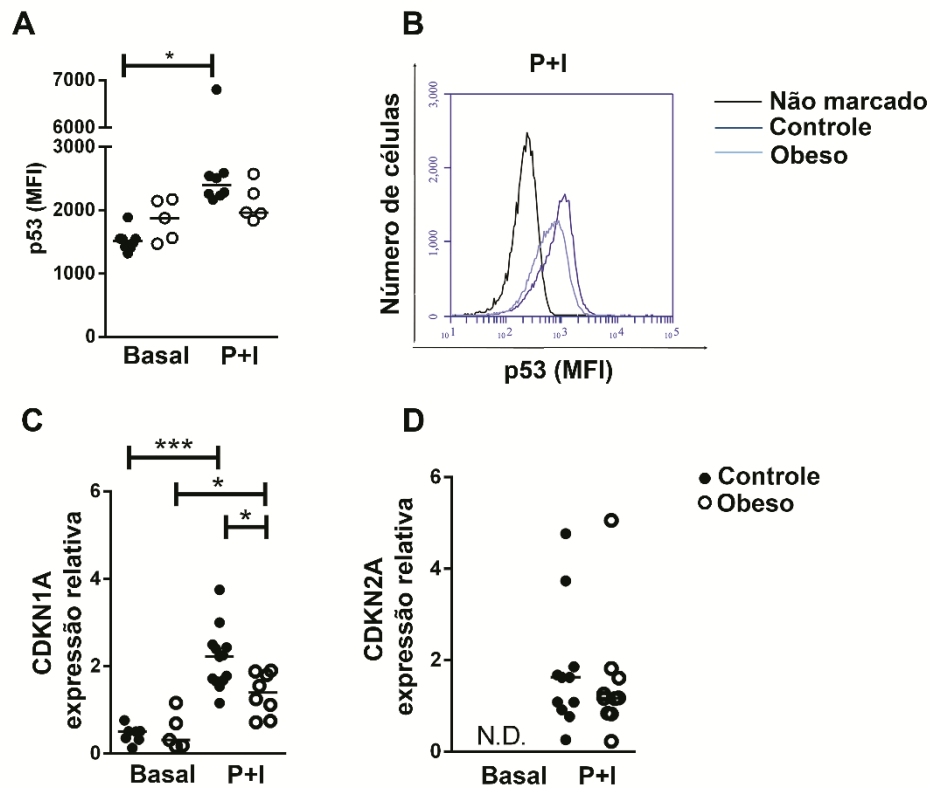


Figura 5. Sinalização comprometida da via TP53/CDKN1A (TP53/P21) em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise por citometria de fluxo através da técnica de *Phosflow* com níveis similares de fosforilação de TP53 (pS37) presentes em indivíduos eutróficos (controles) e portadores de obesidade de PBMC avaliadas imediatamente após o isolamento (*ex vivo*, basal) e níveis significativamente diminuídos de fosforilação de TP53 (pS37) nos indivíduos portadores de obesidade 2 horas após o estímulo mitogênico com 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). (B) Histogramas representativos da fosforilação de p53 (pS37) em indivíduos controles e indivíduos com obesidade após 2 horas de estímulo (P+I). Análise de expressão gênica através de PCR em tempo real mostra níveis similares da expressão gênica de (C) CDKN1A (p21), entre indivíduos eutróficos (controles) e portadores de obesidade em PBMC avaliadas imediatamente após o isolamento (basal). Níveis significativamente diminuídos da expressão gênica de *CDKN1A* (p21) foram observados nos indivíduos portadores de obesidade após 120 horas em cultura e com o estímulo mitogênico de 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). (D) Análise através de PCR em tempo real expressão gênica de *CDKN2A* (p16^{INK4a}) ausente na condição *ex vivo* e similar entre indivíduos eutróficos (controles) e portadores de obesidade em PBMC avaliadas 120 horas após o estímulo mitogênico de 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). Controle n= 15, obeso n=11. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. A linha horizontal nos gráficos de ponto representa a medida de tendência central de mediana. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***)

II.3.3.3 Sinalização da via pERK1/2 comprometida em PBMC de indivíduos com obesidade

Como a sinalização via pERK1/2 está envolvida na proliferação, apoptose e senescência, investigamos sua fosforilação nas PBMC *ex vivo* e após duas horas de estímulo mitogênico com PMA+IONO. Constatou-se que indivíduos portadores de obesidade apresentam maior sinalização de pERK1/2 nas PBMC *ex vivo* em relação aos controles eutróficos. No entanto, após o estímulo de PMA+IONO, a sinalização de pERK1/2 está diminuída nos PBMC de indivíduos portadores de obesidade (Figura 6A e 6B).

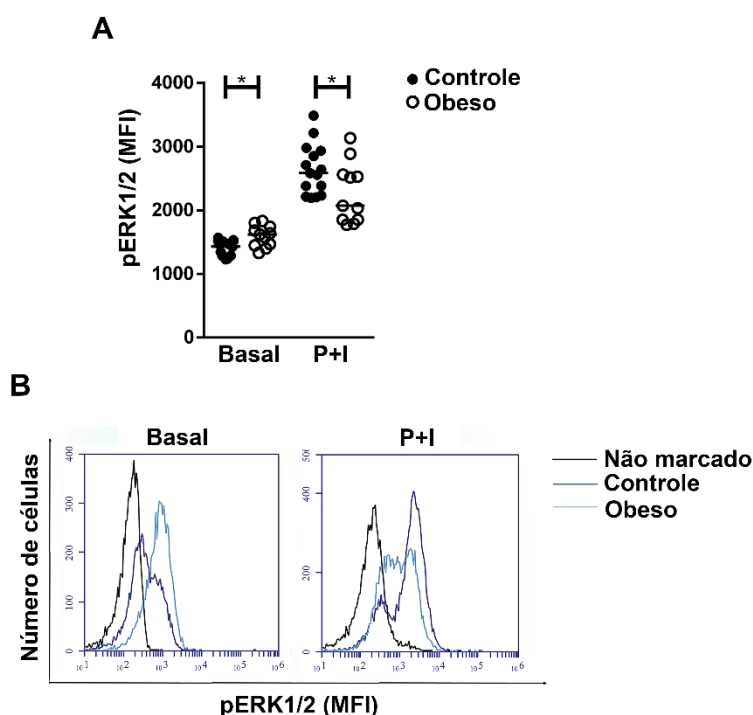


Figura 6. Sinalização comprometida de pERK1/2 em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise por citometria de fluxo através da técnica de *Phosflow* mostra maior sinalização de pERK1/2 em PBMC de indivíduos portadores de obesidade avaliadas imediatamente após o isolamento (basal). Por outro lado, a sinalização de pERK1/2 em PBMC de indivíduos com obesidade avaliada duas horas após o estímulo mitogênico de 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I) está diminuída em relação aos controles eutróficos. (B) Histogramas representativos da fosforilação de pERK1/2 em indivíduos controles e indivíduos com obesidade *ex vivo* (basal) e após 2 horas de estímulo com 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). Controle n= 15, obeso n=11. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. A linha horizontal nos gráficos de ponto representa a medida de tendência central de mediana. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,05 (*).

II.3.3.4 Aumento da secreção de citocinas por PBMC de indivíduos com obesidade

Embora as mudanças metabólicas no tecido adiposo de indivíduos portadores de obesidade sejam as maiores responsáveis pelo perfil inflamatório, as alterações fenotípicas no sistema imune destes indivíduos também podem contribuir com a inflamação crônica periférica de baixo grau observada no contexto da obesidade. O aumento da secreção de citocinas pode ser resultado tanto da ativação imune quanto da senescência celular, tanto nos linfócitos como nos monócitos. Assim, foi avaliada a resposta inflamatória de PBMC de indivíduos com obesidade e controles eutróficos frente ao estímulo mitogênico de PMA+IONO. Foi observado que indivíduos portadores de obesidade possuem maior sinalização de NF κ B, fator de transcrição de citocinas inflamatórias, nas PBMC *ex vivo* (Figura 7A e 7B). Além disso, após 24 horas de cultura, foi possível observar uma maior secreção de TNF- α e TGF- β pelas PBMC de indivíduos com obesidade. Por outro lado, houve uma redução na secreção de TGF- β pelas PBMC de indivíduos com obesidade entre 24 e 120 horas, enquanto a secreção de TNF- α permaneceu constante. Ainda, em 120 horas de cultura foi observada maior secreção de IL-8, IL-6 e TNF- α pelas PBMC de indivíduos com obesidade, confirmando o perfil inflamatório destas células (Figura 7C).

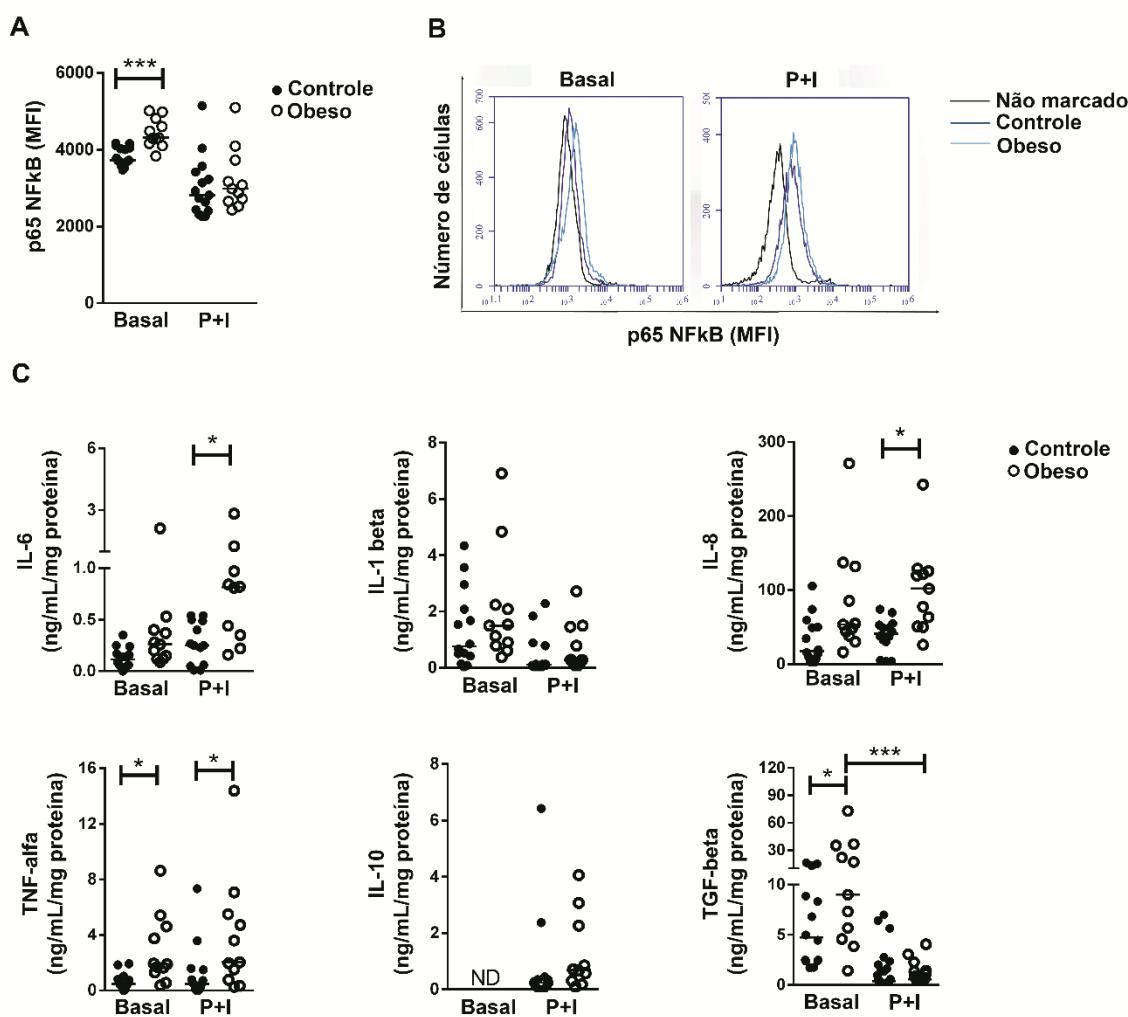


Figura 7. Sinalização inflamatória em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. (A) Análise por citometria de fluxo através da técnica de *Phosflow* mostra maior sinalização do fator p65 do NFκB em PBMC de indivíduos com obesidade foi avaliada imediatamente após o isolamento (*ex vivo*, basal) ou após 2 horas de cultura (P+I). (B) Histogramas representativos da fosforilação de p65 (pNFκB) em indivíduos controle e indivíduos com obesidade (*ex vivo*, basal) e após 2 horas de estímulo com 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). (C) Maior secreção de citocinas inflamatórias em PBMC de indivíduos portadores de obesidade após 24 e 120 horas de estímulo com 10 nM de PMA e 500 nM de Ionomicina (P+I). Controle n= 15, obeso n=11. MFI: mediana de intensidade de fluorescência. A linha horizontal nos gráficos de ponto representa a medida de tendência central de mediana. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma via seguida de Teste Tukey. P < 0,05 (*); P < 0,001 (***).

II.3.4 Conclusões parciais

1. Indivíduos portadores de obesidade apresentam menor fosforilação de H2AFX, reparo de dano ao DNA comprometido e aumento da frequência de micronúcleos. Esses achados sugerem que a obesidade pode ser vista como uma condição patológica associada a instabilidade genômica;

2. A morte celular aumentada em indivíduos portadores de obesidade, tanto em PBMC quanto em células epiteliais da mucosa oral, pode ocorrer como consequência da instabilidade genômica;

3. Além da via da H2AFX, outras importantes vias de sinalização relacionadas com parada e progressão do ciclo celular estão comprometidas em indivíduos portadores de obesidade, como a via TP53/CDKN1A (p53/p21) e pERK1/2;

4. As PBMC de indivíduos portadores de obesidade contribuem para o estado de metainflamação observado na obesidade, secretando maiores quantidades de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- α .

PARTE III

III.1 DISCUSSÃO

O envelhecimento e a obesidade são os principais fatores de risco para condições que aumentam a morbidade e mortalidade da população, incluindo doenças crônicas inflamatórias como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática e câncer (Schafer *et al.*, 2017). No contexto da obesidade, o tecido adiposo assume um importante papel endócrino e é capaz de regular a homeostase do organismo, tendo efeitos deletérios principalmente sobre a resistência a insulina, a angiogênese, a pressão arterial e a função imune (Galic *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, importantes estudos tem demonstrado que as modificações do tecido adiposo durante a obesidade também refletem de forma sistêmica através de alterações significativas nas vias de sinalização associadas a inflamação (Schmidt *et al.*, 2015, Garrison *et al.*, 2017), no perfil de adipocinas (Karonova *et al.*, 2018), no balanço redox e no atrito telomérico (Grun *et al.*, manuscrito submetido) no sangue periférico. Apesar de bem estabelecidas, o impacto destas alterações sobre o sistema imune tem sido pouco explorado na literatura. Neste sentido, tem se discutido a obesidade como um modelo de imunosenescência prematura, principalmente devido a inflamação crônica de baixo grau associada a uma menor resposta a infecções e a vacinação (Castro, 2012). No entanto, os mecanismos moleculares a nível celular associados a estas alterações clínicas necessitam ser melhor compreendidos.

Afim de investigar possíveis mecanismos associados ao envelhecimento prematuro de linfócitos e monócitos/macrófagos em indivíduos portadores de obesidade, utilizamos duas estratégias. Primeiramente, estabelecemos em nosso

laboratório uma modelo de cultura celular que mimetiza a inflamação sistêmica durante a obesidade, através da cultura primária de células do sistema imune ou de cultura de linhagens celulares representativas de células do sistema imune na presença de meio de cultura suplementado com o plasma dos indivíduos em estudo. Modelos de cultura celular semelhantes já foram utilizados com sucesso por nosso laboratório (Ferrari *et al.*, manuscrito aceito para publicação) e por outros (Wollenhaupt-Aguiar *et al.*, 2016) afim de estudar mecanismos moleculares envolvidos na patogênese de doenças psiquiátricas.

Após obtermos alguns resultados promissores com este modelo, confirmamos as alterações encontradas em células coletadas dos próprios indivíduos portadores de obesidade e ampliamos a abordagem de nossos principais resultados por abordagens mecanicistas *ex vivo*. Os resultados conjuntos destas duas estratégias nos forneceram dados que estabelecem a obesidade como uma condição patológica associada ao envelhecimento prematuro, confirmando a hipótese de que as alterações que ocorrem no tecido adiposo durante a obesidade impactam de forma negativa em células periféricas do sistema imune. Um resumo com as principais alterações encontradas nesta tese pode ser visualizado na Figura1.

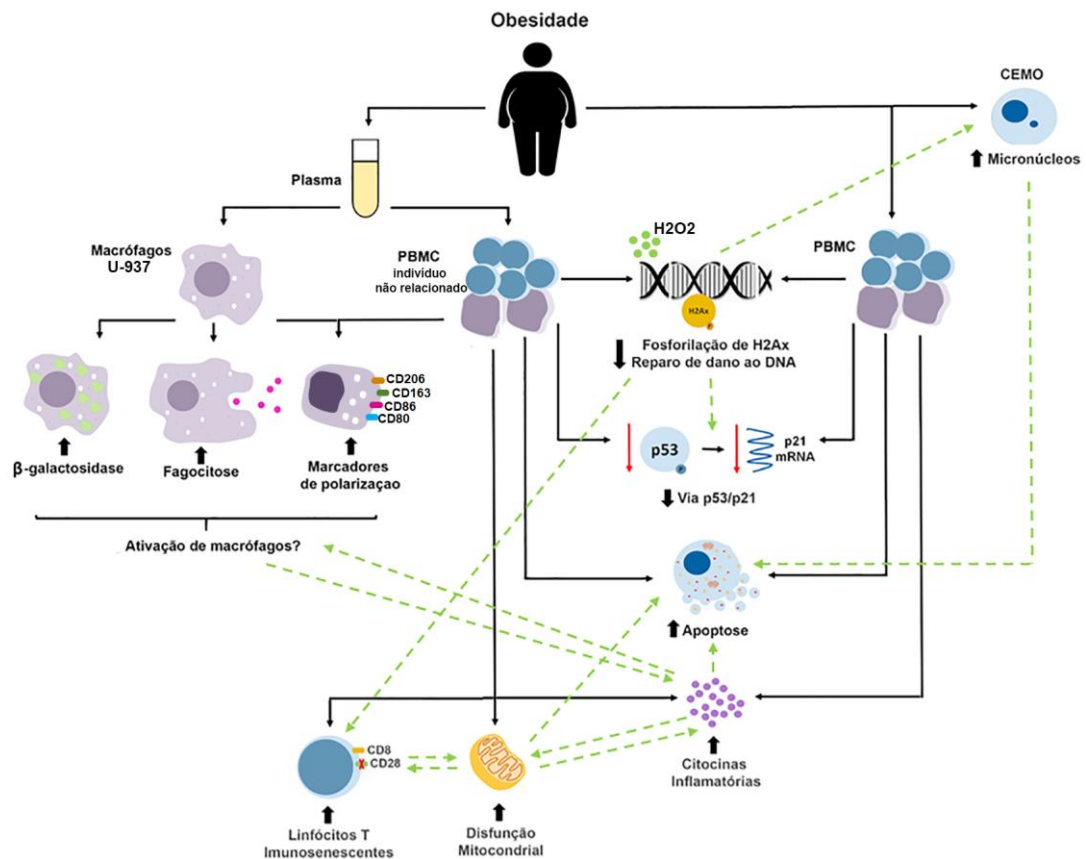


Figura 1. Visão geral dos principais resultados obtidos nesta tese. O plasma de indivíduos portadores de obesidade induziu ativação de macrófagos U-937, exemplificado principalmente pelo aumento de atividade β -galactosidase, da atividade fagocítica da expressão proteica de marcadores de polarização de macrófagos (tanto em macrófagos U-937 quanto em monócitos primários). Além disso, o plasma de indivíduos portadores de obesidade modulou a diminuição de fosforilação de H2AFX, da sinalização da via TP53/CDKN1A (p53/p21), e aumento de apoptose e de linfócitos TCD8⁺CD28⁻, da secreção de citocinas inflamatórias e da disfunção mitocondrial relacionada a diminuição de consumo de O₂ basal e relacionado a produção de ATP em PBMC saudáveis de indivíduo não-relacionado. Além disso, este fenótipo se confirmou em PBMC extraídas de indivíduos portadores de obesidade através de uma DDR defeituosa e comprometimento da sinalização via H2AFX e p53/p21, aumento de apoptose e de secreção de citocinas inflamatórias. Ainda, houve aumento da frequência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos portadores de obesidade. As setas pretas representam os resultados obtidos nesta tese, as setas verdes representam as possíveis relações entre os resultados encontrados. CEMO: células epiteliais da mucosa oral; PBMC: células mononucleares de sangue periférico, H₂O₂: peróxido de hidrogênio, CD80: molécula coestimulatória B7.1, CD86: molécula coestimulatória B7.2, CD163: receptor de sequestro rico em cisteína, CD206: receptor de manose de macrófagos.

A alteração mais notória decorrente de nossos resultados durante a obesidade foi a instabilidade genômica. Neste contexto, os indivíduos portadores de obesidade apresentaram cinética de reparo de dano ao DNA alterada e sinalização de H2AFX diminuída em PBMC e aumento da frequência de micronúcleos, marcadores de dano ao DNA persistente, nas células epiteliais da mucosa oral.

Corroborando com estes dados, alguns estudos também tem relacionado a obesidade e suas comorbidades a instabilidade genômica em vários tipos celulares, tanto em humanos como em animais (Tenorio *et al.*, 2013, Cerda *et al.*, 2014, Luperini *et al.*, 2015, Shah e Mahmoudi, 2015, Vergoni *et al.*, 2016). Além disso, a correlação positiva entre marcadores de dano ao DNA e o IMC, a pressão arterial, a circunferência abdominal e a concentração de proteína C reativa no plasma já foi demonstrada (Karbownik-Lewinska *et al.*, 2012).

O mecanismo de DDR eficiente é essencial para a manutenção da estabilidade genômica e para a sobrevivência celular. Neste âmbito, o reparo ineficiente do dano ao DNA pode induzir diferentes desfechos para as células, como apoptose, senescência e transformação neoplásica. O impacto negativo de uma DDR comprometida pode ser exemplificado por doenças como as Síndromes de Ataxia Telangiectasia, Bloom ou Nijmegen Breakage. Indivíduos com estas patologias possuem, simultaneamente, função de DDR comprometida e instabilidade genômica e são clinicamente caracterizados pela imunodeficiência, pelo envelhecimento prematuro e pelos altos índices de câncer (Georgoulis *et al.*, 2017). Ainda, a observação de que vários genes relacionados a DDR estão inativados durante a progressão do câncer suporta a ideia de que estes genes são importantes na proteção da célula contra o desenvolvimento tumoral (Halazonetis, 2002).

Nesta perspectiva, sugerimos que a obesidade pode também ser vista como uma doença caracterizada pela instabilidade genômica. Assim, indivíduos com obesidade podem ter seu fenótipo celular agravado como consequência do dano persistente ao DNA e, em última instância, apresentar maior predisposição ao desenvolvimento de câncer, como câncer de cólon (Frezza *et al.*, 2006) e de ovário (Liu *et al.*, 2015) entre outros; ou aumento do fenótipo de envelhecimento, comprometendo a função tecidual. Em concordância, trabalho de nosso grupo (Grun

et al, manuscrito submetido) demonstrou que indivíduos portadores de obesidade apresentam um maior atrito telomérico e perda da homeostase das proteínas do complexo *Shelterin*, que protege os telômeros, quando comparados com indivíduos eutróficos. Esse resultado sugere que fatores inflamatórios e oxidativo da obesidade podem ser catalisadores de eventos neoplásicos. Além disso, a instabilidade genômica dos indivíduos portadores de obesidade pode ser um fator que interfere na resposta ao tratamento de câncer. Recentemente um estudo mostrou que DDR comprometida em PBMC de mulheres com câncer de ovário está correlacionado com a resistência das células tumorais a quimioterapia (Stefanou *et al.*, 2015), sugerindo, juntamente com nossos dados, que a DDR comprometida de PBMC de indivíduos com obesidade podem ser um preditor de uma pior resposta ao tratamento do câncer durante a obesidade.

A γ H2AFX exerce importante papel na formação dos *foci* de DDR. Nossos dados indicam uma sinalização alterada de H2AFX nas PBMC durante a obesidade, o que pode ser, pelo menos em parte, a causa da DDR comprometida. Neste contexto, vários estudos demonstram a importância da γ H2AFX para a homeostase celular. Células deficientes em H2AFX possuem alta sensibilidade a radiação, retardo no crescimento e senescência prematura. Camundongos nocautes para γ H2AFX apresentam sinais de deficiência imunológica e aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores (Bassing *et al.*, 2002, Celeste *et al.*, 2002, Celeste *et al.*, 2003a), sendo que algumas destas características também são observadas em indivíduos com obesidade (Castro, 2012).

A alteração encontrada na fosforilação de H2AFX e na DDR durante a obesidade pode sofrer influência de vários fatores. Primeiramente, a resposta da histona H2AFX em diferentes tipos de células nem sempre é similar. Além disso, a quantidade de H2AFX em relação a quantidade de H2A na cromatina pode ser

diferente entre tipos celulares distintos, sendo que a porcentagem de H2AFX pode variar de 10 a 25% em relação a H2A total da célula. Ainda, a localização da H2AFX ao longo de todo genoma de cada célula em diferentes estágios de diferenciação celular ou sob condições de estresse não é totalmente compreendido (Georgoulis *et al.*, 2017). Assim, o estágio de diferenciação das células utilizadas em nosso estudo, bem como a condição de estresse ocasionada pela obesidade pode ter impacto relevante na capacidade da H2AFX responder a indução de dano ao DNA.

Uma função muito importante da cromatina nuclear é conferir proteção física ao DNA. No entanto, a cromatina também pode influenciar a sinalização de DDR no local do DNA danificado. Por exemplo, células com heterocromatina são resistentes a fosforilação de H2AFX. Corroborando este fato, a diminuição do grau de heterocromatização nas células ocasiona o aumento da sinalização de H2Ax e de DDR (Kim *et al.*, 2007, Murga *et al.*, 2007), sendo que as DSB que ocorrem dentro da heterocromatina não são eficientemente reparadas (Goodarzi *et al.*, 2008, Di Micco *et al.*, 2011). Somado a isso, uma característica comum aos diferentes tipos de tumores é a alta frequência de heterocromatina (cromatina compactada), que pode atenuar a sinalização de DDR e promover a sobrevivência tumoral mesmo na presença de danos ao DNA (Sulli *et al.*, 2012). Assim, podemos especular que células de indivíduos portadores de obesidade poderiam ter aumento da frequência de heterocromatina, principalmente induzida pela senescência celular, e, como consequência, apresentarem uma DDR comprometida. Entretanto, uma limitação de nosso trabalho é a falta de imagens de microscopia eletrônica para evidenciar esse fato.

Apesar de termos encontrado em nossa coorte de estudo menor fosforilação de H2AFX, um estudo realizado com crianças italianas com sobrepeso e obesidade relatou aumento na fosforilação de H2AFX nas PBMC e que, independente do *status*

de peso, crianças controles e crianças portadoras de obesidade apresentaram cinética de reparo de dano ao DNA semelhante (Scarpato *et al.*, 2011). Como em nosso trabalho utilizamos adultos portadores de obesidade, especulamos que o tempo de obesidade (registro que não temos) possa exercer influência na sinalização e cinética de reparo de dano ao DNA.

Uma das consequências do insulto genotóxico persistente associado a um reparo ineficiente do dano ao DNA é a formação de micronúcleos nas células. Os micronúcleos são segmentos nucleares não incorporados a cromatina que podem surgir como resultado de DSB ou de disfunção do aparelho do fuso mitótico. Os micronúcleos são infreqüentes durante a mitose de células saudáveis, no entanto, podem estar aumentados em algumas patologias (Aykanat *et al.*, 2016). Na maioria das vezes, as células com micronúcleos podem ser removidas por apoptose. No entanto, a persistência de células com micronúcleos indica instabilidade genômica e pode ser um fator de risco adicional para desenvolvimento de câncer. Além de micronúcleos, outros marcadores são relevantes para o estudo de anomalias nucleares, como as células binucleadas, que são indicativas de citotoxicidade, e como a presença de a cariólise, picnose, a cariorrexe e a condensação de cromatina, que são indicadores de morte celular (Hintzsche *et al.*, 2017). Assim, detectamos aumento da frequência de micronúcleos e cariólise em células epiteliais da mucosa oral de indivíduos com obesidade, fato que confirma a obesidade como uma patologia associada a instabilidade genômica e a morte celular prematura em diferentes tecidos (tecido imune e epitelial).

Os principais destinos da célula com DNA não reparado são a apoptose e a senescência. Somado a instabilidade genômica, demonstramos que as PBMC de indivíduos portadores de obesidade apresentam aumento na frequência de células em apoptose e, que, o plasma de indivíduos portadores de obesidade induz

apoptose e imunosenescência em linfócitos previamente saudáveis. Neste contexto, a apoptose é um mecanismo que permite uma rápida eliminação das células disfuncionais pelos fagócitos sem estimular inflamação. Por outro lado, a senescência celular gera uma resposta inflamatória que pode agir de maneira parácrina e modular o fenótipo de outras células e, assim, ter impacto sistêmico (Childs *et al.*, 2014).

A escolha do destino celular entre apoptose ou senescência pode ser induzida por diversos fatores. Na maioria dos casos, a apoptose é uma resposta induzida frente a um dano mais severo enquanto a senescência é induzida como consequência de danos menos graves. Por exemplo, em baixas doses, o fármaco doxorrubicina induz senescência e, em altas doses, induz apoptose em células de câncer de mama e cardiomiócitos (Spallarossa *et al.*, 2009, Altieri *et al.*, 2012). De maneira semelhante, o dano oxidativo via H₂O₂ e raios ultravioleta UVB provoca apoptose em altas concentrações e senescência em baixas concentrações em fibroblastos (Chen e Ames, 1994). No entanto, o tipo de célula também pode determinar a resposta ao estresse, ou seja, diferentes tipos celulares podem optar por desfechos diferentes perante o mesmo insulto (Childs *et al.*, 2014).

As vias de sinalização ativadas em resposta ao estresse celular também são determinantes do desfecho celular. Neste âmbito, a principal proteína ativada em resposta ao dano ao DNA é a proteína tumoral TP53, considerada uma via de intersecção entre o reparo de dano ao DNA, a apoptose e a senescência celular. Surpreendentemente, nossos resultados apontam que as PBMC de indivíduos portadores de obesidade apresentam menor sinalização de TP53 em resposta a estímulos estressores do que indivíduos eutróficos. Esses resultados são contrários ao que tem sido descrito no tecido adiposo (Minamino *et al.*, 2009) e ocorrem mesmo na presença de maior taxa de apoptose.

O nível de ativação de TP53 é essencial para a escolha da célula entre a indução de apoptose ou de senescência (Kracikova *et al.*, 2013). Neste contexto, a apoptose é ativada apenas quando a TP53 atinge seu limiar mais alto de fosforilação (Mombach *et al.*, 2014). Assim, sugerimos que as PBMC de indivíduos portadores de obesidade que alcançaram o nível mais alto de ativação da TP53 entraram em apoptose, sendo que as células restantes, resistentes a apoptose, tiveram uma ativação intermediária de TP53, que permite dois destinos distintos: o reparo de dano ao DNA e perpetuação do ciclo celular ou parada do ciclo celular e indução de senescência. Esta hipótese é suportada ainda mais pelo fato de que, no ensaio de MTT (capítulo 1), não observamos diminuição da viabilidade celular entre 24 e 120 horas de cultura das PBMC saudáveis incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade, mostrando que a morte celular (por apoptose) pode ter sido uma resposta prematura ao insulto agudo inicial, e as células restantes na cultura, resistentes a morte celular, reparam seu DNA ou entraram em senescência (linfócitos TCD8⁺CD28⁻).

Um importante alvo da proteína TP53 em resposta a insultos genotóxicos é o gene CDKN1A (p21). A expressão da proteína CDKN1A (p21) é um regulador negativo da apoptose dependente de TP53, possivelmente por inibir a caspase 3. Sendo assim, a diminuição da expressão ou degradação de CDKN1A (p21) resulta em defeitos de replicação de DNA e pode induzir a morte celular (Gartel e Radhakrishnan, 2005, Chen *et al.*, 2015a). Neste estudo, corroborando com o aumento de apoptose, demonstramos menor sinalização da via TP53/CDKN1A (P53/P21) em indivíduos portadores de obesidade. Neste contexto, um estudo prévio demonstrou que células nocautes para H2AFX não são capazes de aumentar a expressão de CDKN1A (P21) mesmo na presença de dano ao DNA. Assim, foi elucidado que a H2AFX é fundamental para aumentar os níveis de CDKN1A (P21), e

que, na sua ausência, as células respondem ao dano ao DNA com morte celular (Fragkos *et al.*, 2009).

A apoptose é considerada um importante mecanismo associado ao envelhecimento do sistema imune (Phelouzat *et al.*, 1996). No decorrer do processo do envelhecimento, as diferentes subpopulações de linfócitos T aumentam sua sensibilidade a apoptose via receptor de morte e caspases 8 e 3 (Gupta, 2005). Assim, o aumento da apoptose nas PBMC de indivíduos portadores de obesidade sugere que a obesidade, assim como o envelhecimento, pode sensibilizar os linfócitos T a apoptose precoce. Ainda, durante a obesidade, ocorre aumento de moléculas indutoras de morte celular no plasma de indivíduos com obesidade, como o TNF- α . Estas moléculas podem induzir apoptose nos linfócitos e, conseqüentemente, linfopenia e imunodeficiência prematura, gerando um fenótipo imunológico semelhante ao observado durante o envelhecimento. Neste âmbito, uma limitação do nosso trabalho é a ausência de valores de contagem total absoluta das diversas subpopulações de linfócitos T e B para avaliar se há uma correlação inversa entre o aumento de apoptose e a diminuição absoluta de subtipos de linfócitos na obesidade.

Além da indução de apoptose, observamos que o plasma de indivíduos portadores de obesidade é capaz de modular o fenótipo de PBMC previamente saudáveis, induzindo aumento da frequência de linfócitos senescentes após cinco dias (120 horas) de cultura. A modulação fenotípica que ocorre nos linfócitos senescentes é a perda da expressão da proteína CD28, a qual diminui cerca de 20 a 30% durante o envelhecimento e ocorre de maneira mais acelerada entre os linfócitos T CD8⁺ do que entre os linfócitos T CD4⁺, possivelmente devido a maior proliferação dos linfócitos citotóxicos (Pinti *et al.*, 2016). Assim como o esperado,

neste trabalho a perda da expressão da molécula CD28 foi mais acentuada nos linfócitos T CD8⁺.

A perda da expressão de CD28 na membrana dos linfócitos T pode ser induzida por dois mecanismos. O principal deles é a intensa proliferação celular devido a ativação do receptor de células T (TCR) induzida por estímulos antigênicos ao longo da vida. Por outro lado, a presença de citocinas como IL-2, IL-17, interferon do tipo I e TNF- α podem levar a redução na expressão de CD28 através da ativação da via de estresse p38 MAPK e através da regulação negativa da enzima telomerase (Pinti *et al.*, 2016). Sendo assim, condições inflamatórias como a obesidade podem acelerar a indução de imunossenescência em linfócitos, assim como demonstramos *in vitro*.

O aumento da proporção de células T CD8⁺CD28⁻ tem sido relacionado com uma menor resposta imune após a imunização, com um maior risco de mortalidade e expectativa de vida e de saúde reduzida (Bauer e Fuente Mde, 2016). Corroborando com estes dados, a obesidade apresenta sinais clínicos de imunossenescência prematura, possuindo também resposta imunológica comprometida frente a infecções e vacinação (Sheridan *et al.*, 2012, Huttunen e Syrjanen, 2013). Somado a isso, um estudo com crianças mexicanas constatou que crianças com sobrepeso possuem maior frequência de linfócitos TCD8⁺ senescentes (CD8⁺CD28⁻) e crianças obesas possuem maior frequência de linfócitos TCD4⁺ senescentes (CD4⁺CD28⁻) do que crianças com peso normal (Spielmann *et al.*, 2014).

Trabalhos experimentais com camundongos também dão suporte a nossa hipótese de imunossenescência presente na obesidade. Animais obesos apresentaram sinais de estresse oxidativo exacerbado e imunossenescência em células do sistema imune do baço, com diminuição da proliferação de linfócitos em resposta ao mitôgeno Concanavalina A e reduzida atividade das células assassinas

naturais (NK) (Gheorghe *et al.*, 2017). Além disso, camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentam células T com fenótipo associado a senescência e responsáveis pela resistência à insulina através da secreção de osteopontina (OPN) (Shirakawa *et al.*, 2016). Entretanto, outras alterações encontradas no sistema imune de camundongos obesos foram a quimiotaxia diminuída de macrófagos e linfócitos, fagocitose diminuída de macrófagos, menor proliferação de linfócitos e menor secreção de IL-6, IL-2, IL-10, IL-1 β e TNF- α (Hunsche *et al.*, 2016), dados diferentes dos encontrados neste trabalho. Ainda, a restrição calórica é capaz de diminuir a senescência celular e aumentar a expectativa de vida e longevidade dos indivíduos (Fontana *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, a perda da expressão de CD28 é acompanhada de telômeros encurtados, diminuição da atividade da enzima telomerase, aumento da expressão de CDKN1A e CDKN2A e resistência a apoptose. Corroborando com o aumento de linfócitos TCD8⁺CD28⁻ *in vitro*, resultados do nosso grupo de pesquisa mostraram que PBMC de indivíduos com obesidade sofrem repressão epigenética da subunidade TERT da telomerase (Pierdoná *et al.*, manuscrito em preparação) e possuem telômeros encurtados (Grun *et al.*, manuscrito submetido a publicação).

A proteína CDKN2A (p16) é um importante marcador de senescência, sendo que sua expressão é muito baixa ou indetectável em células normais, mas torna-se prontamente detectável após a indução de senescência por uma variedade de estímulos. Neste contexto, alguns autores sugerem que a sinalização via TP53/CDKN1A (P53/P21) inicia a senescência, enquanto a sinalização de CDKN2A (p16) é necessária para a manutenção do fenótipo senescente (Beausejour *et al.*, 2003). No entanto, apesar de termos observado aumento de células T CD8⁺CD28⁻ nas PBMC incubadas com plasma de indivíduos com obesidade, não foi possível detectar a expressão de CDKN2A (p16) através de PCR em tempo real nestas

células (dado não mostrado). Ainda, quando avaliamos a expressão de *CDKN2A* nas PBMC dos próprios indivíduos portadores de obesidade, demonstramos que não foi possível detectar sua expressão nas PBMC *ex vivo*, mas foi possível detectá-la após 120 horas de cultura, quando ativadas com PMA+IONO, sem diferença significativa na sua expressão entre indivíduos com obesidade e controles eutróficos.

Além de características de imunossenescência em linfócitos, o plasma de indivíduos portadores de obesidade induziu aumento de expressão da enzima β -galactosidase em macrófagos diferenciados a partir da linhagem celular U-937. A β -galactosidase é um importante marcador de senescência, fortemente correlacionado a expressão de outros marcadores, como a expressão de *CDKN1A* e *CDKN2A*. No entanto, nos macrófagos, a β -galactosidase pode ter sua expressão aumentada não apenas durante a senescência, mas também em resposta a estímulos imunomoduladores e na presença de células apoptóticas (Hall *et al.*, 2017). Neste sentido, nossos resultados mostraram aumento de β -galactosidase sem aumento concomitante da área nuclear e da expressão de *CDKN1A* e *CDKN2A*, sugerindo que o aumento de β -galactosidase ocorreu como consequência de estímulos imunomoduladores presentes no plasma de indivíduos com obesidade. Assim, a indução de macrófagos associados a senescência (SAM), que expressem marcadores como a β -galactosidase, pode representar um tipo específico de ativação ou diferenciação de macrófagos em resposta a certos estímulos fisiológicos ou patológicos e não necessariamente senescência (Hall *et al.*, 2017).

O acúmulo de SAM pode ser uma manifestação da resposta imune inata que leva a inflamação sistêmica estéril crônica típica de organismos idosos. Neste contexto, os macrófagos, independentemente de sua condição de senescentes ou patologicamente ativados, são células chaves na indução e manutenção da inflamação, sendo que o termo *macroph-aging* é utilizado para descrever o efeito da

ativação crônica dos macrófagos durante o envelhecimento, o qual contribui para o *inflamm-aging* através da secreção desregulada de mediadores inflamatórios (Prattichizzo *et al.*, 2016). Assim, a ativação de macrófagos que ocorre durante a obesidade é referida como ativação metabólica. Os principais ativadores de macrófagos durante a obesidade são os ácidos graxos saturados, que servem como ligantes do receptor semelhante a Toll (TLR)-4, induzindo mudanças inflamatórias nos monócitos/macrófagos através da ativação de NF κ B (Castro, 2012). Embora não tenhamos quantificado a expressão de membros da família TLR a nível proteico ou de expressão gênica, nossas análises de bioinformática demonstram que a via de sinalização por TLR4 aparece enriquecida em múltiplas bases de dados, salientando a importância da via Toll no estabelecimento do perfil de expressão inflamatória dos monócitos durante a obesidade (Pierdoná *et al.*, manuscrito em preparação).

Além disso, estudo recente conduzido por Hall e colaboradores (2016) demonstrou que fibroblastos senescentes podem propagar o fenótipo senescente para as células do sistema imune. Este fato foi evidenciado através da inoculação de células senescentes ligadas a microesferas de alginato em camundongos que expressam a proteína luciferase sob promotor do gene *CDKN2A* (p16). As células senescentes inoculadas promoveram quimioatração de células imunes, principalmente macrófagos, através da secreção de mediadores solúveis. Mais importante, estes fatores secretados induziram a expressão de marcadores associados a senescência nos macrófagos: *CDKN2A* (p16) e β -galactosidase. Estes dados evidenciam que células senescentes podem induzir senescência em células imunológicas de maneira parácrina (Hall *et al.*, 2016) e apoiam nossa hipótese de que os mediadores inflamatórios secretados pelas células senescentes no tecido adiposo presentes na obesidade, principalmente adipócitos, podem refletir no plasma e amplificar a indução de senescência em células do sistema imune,

principalmente nos linfócitos e macrófagos. Além disso, é provável que mudanças exógenas no microambiente em combinação com a inflamação crônica de baixo grau observada no plasma de indivíduos portadores de obesidade modulem programas de ativação de macrófagos e suas respostas aos estímulos (Oishi e Manabe, 2016).

Neste contexto, os macrófagos incubados com plasma de indivíduos portadores de obesidade apresentaram maior taxa de fagocitose, evidenciando a capacidade do plasma de indivíduos com obesidade de modular a resposta de macrófagos aos estímulos. No entanto, dados da literatura apontam que tanto durante a imunossenescência quanto durante a obesidade (Oishi e Manabe, 2016) ocorre diminuição da atividade fagocítica dos fagócitos mononucleares. Neste contexto, macrófagos de camundongos obesos possuem capacidade diminuída de fagocitar células apoptóticas, sugerindo o impacto da disfunção metabólica durante a obesidade sobre a funcionalidade do sistema imune (Li *et al.*, 2009).

Assim, um importante ponto a ser discutido, considerando as alterações observadas nos linfócitos e macrófagos em relação ao seu envelhecimento prematuro durante a obesidade, é que a imunossenescência não é um termo com o mesmo significado que o conceito de biologia celular de "senescência replicativa", pelo qual as células somáticas humanas, como os fibroblastos, atingem a parada do ciclo celular após um número finito de divisões celulares (Hayflick e Moorhead, 1961). De acordo com Pawelec (2017), o termo imunosenescência representa um conjunto de parâmetros que são diferencialmente expressos entre células do sistema imune de indivíduos jovens e idosos e que tenham sido associados a uma situação clínica compatível, como mortalidade, fragilidade, má resposta a vacinação ou as infecções.

A via de sinalização da *extracellular signal-regulated kinase* (Erk)/*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) medeia o efeito dos fatores de crescimento na regulação da progressão do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular (Chang *et al.*, 2003). Neste contexto, demonstramos que PBMC de indivíduos com obesidade apresentam maior sinalização de ERK1/2 *ex vivo*. No entanto, após o estímulo mitogênico, ocorre menor sinalização desta proteína em PBMC de indivíduos portadores de obesidade. Estes dados sugerem que as PBMC desses indivíduos possuem uma capacidade proliferativa desregulada. Ainda, um estudo prévio mostrou que células incapazes de sinalizar via MAPK/ERK1/2 possuem redução na capacidade proliferativa, parada de ciclo celular em G1, aumento de apoptose, encurtamento de telômeros e instabilidade genômica (Chen *et al.*, 2015b).

Juntamente com a instabilidade genômica e a senescência celular, a disfunção mitocondrial é um importante marcador do envelhecimento (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Nas mitocôndrias funcionais, a captação de oxigênio, a produção de ATP, o potencial de membrana e a geração de ROS estão regulados de forma rigorosa para manter a homeostase redox (Brand, 2016). Por outro lado, estudos recentes tem relatado que as células senescentes possuem disfunção mitocondrial, elevada produção de ROS, aumento na ativação de p38 MAPK e mudanças no metabolismo energético (Pinti *et al.*, 2016). A importância da mitocôndria como organela e associada a senescência celular pode ser ilustrada por trabalho recentemente publicado que mostra que células sem mitocôndrias não entram em senescência (Correia-Melo *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a sobrecarga metabólica que ocorre na obesidade está associada ao desacoplamento da respiração mitocondrial, a função prejudicada da CTE e ao aumento na produção de ROS (Schafer *et al.*, 2017). Corroboramos estes dados mostrando que PBMC expostas por 4 horas ao plasma de indivíduos com

obesidade apresentam diminuição no consumo basal de oxigênio e no consumo de oxigênio relacionado a produção de ATP, sugerindo defeitos na fosforilação oxidativa e no metabolismo energético. Além disso, quando incubamos os macrófagos por 4 horas com plasma de indivíduos com obesidade e SM e avaliamos a massa e potencial de membrana mitocondrial após 120 horas de cultura, observamos uma redução na massa mitocondrial destes macrófagos. Nossa hipótese é de que após 4 horas de insulto com plasma de indivíduos com obesidade ocorre disfunção mitocondrial relacionada a produção de ATP com consequente morte celular, principalmente apoptose. Após o insulto, as células que sobreviverem (resistentes a apoptose) conseguem eliminar as mitocôndrias danificadas e se adaptam a esta nova condição, sobrevivendo. Apesar dos efeitos negativos do plasma sobre a função mitocondrial, não houve diferença na produção de ROS em macrófagos, avaliada pelo DCF-DA, e PBMC, estimada pelo consumo de oxigênio extramitocondrial, expostos ao plasma de indivíduos com obesidade. Estes dados sugerem que a disfunção mitocondrial, independente da produção de ROS, pode estar relacionada, juntamente com a instabilidade genômica, com o aumento de apoptose e senescência durante a obesidade e presente nas células do sistema imune.

Ainda não é totalmente elucidado como a disfunção da CTE pode induzir senescência celular. Algumas hipóteses apontam que as ROS elevadas na mitocôndria afetariam a função da CTE, que, por sua vez, produziria mais ROS, gerando dano oxidativo ao DNA e, conseqüentemente, o aumento de senescência. Por outro lado, a ineficiência da fosforilação oxidativa com produção adequada de ATP induziria um déficit energético que poderia afetar a homeostase celular e a função dos órgãos (Brand e Nicholls, 2011). Vários estudos tem mostrado que a inibição dos complexos I (Miwa *et al.*, 2014), II (Yoon *et al.*, 2003), III (Stockl *et al.*,

2006) da CTE é capaz de induzir senescência celular. Neste contexto, recentemente, um importante estudo demonstrou que o aumento da razão ADP/ATP pela disfunção mitocondrial ativa a AMPK, que por sua vez, pode induzir apoptose ou senescência através da ativação de p53 ou de p16 (Wiley *et al.*, 2016).

A disfunção mitocondrial induz e mantém o estado senescente, enquanto que a senescência, por sua vez, contribui para a indução de disfunção mitocondrial (Passos *et al.*, 2010). Assim, as mitocôndrias disfuncionais presentes em células senescentes produziram níveis aumentados de ROS que agravariam o dano ao DNA e a DRR, contribuindo para o desenvolvimento e a estabilização da senescência (Passos *et al.*, 2010). Ainda, as mitocôndrias disfuncionais liberam várias formas de sinais de perigo como os padrões moleculares associados ao perigo, coletivamente denominados DAMP, especialmente fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA), que são reconhecidos pelos receptores intracelulares de domínios de oligomerização de nucleotídeos semelhantes a NOD, especialmente o NLRP3 (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins 3*), ativando mecanismos pró-inflamatórios (Salminen *et al.*, 2012). Assim, a disfunção mitocondrial e a expressão do SASP são consequências da senescência, indutoras da senescência parácrina e determinantes da estabilização do estado senescente (Schafer *et al.*, 2017).

Finalmente, as PBMC de indivíduos portadores de obesidade apresentam um fenótipo inflamatório em resposta a mitógenos inespecíficos, bem como o plasma destes indivíduos modula células previamente saudáveis a um fenótipo inflamatório, evidenciado pela secreção de citocinas inflamatórias e ativação de monócitos/macrófagos. Corroborando com nossos dados, estudo prévio mostrou que PBMC de indivíduos portadores de obesidade produzem maiores quantidades de TNF- α em resposta ao estímulo de lipopolissacarídeo (LPS) e de IFN- γ e IL-2 em

reposta ao estímulo com PMA (Dicker *et al.*, 2013). O aumento da secreção de mediadores inflamatórios durante a obesidade pode ser explicado por várias razões.

Nos indivíduos portadores de obesidade, um dos principais indutores do fenótipo inflamatório é a leptina. A leptina é uma adipocina aumentada na circulação de indivíduos portadores de obesidade e está envolvida na regulação da função de linfócitos e monócitos (Myers *et al.*, 2010). A sinalização de leptina induz a ativação das MAPK p38, pERK, e STAT3 nas células do sistema imune. Essa sinalização se traduz na secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e de ROS. Esse conjunto de mediadores pode, por sua vez, induzir ou perpetuar o fenótipo inflamatório e senescente (Franceschi e Campisi, 2014). Além disso, o aumento de morte celular com liberação de DAMP também pode favorecer o processo inflamatório no contexto da obesidade. Assim, se as células apoptóticas não forem adequadamente fagocitadas e removidas dos tecidos, podem ser submetidas a necrose secundária, levando a liberação de moléculas que atuam como DAMP ou autoantígenos, ativando as células imunes a produzir mediadores inflamatórios (Oishi e Manabe, 2016).

O aumento de senescência em linfócitos também contribui para a secreção de mediadores inflamatórios. Por exemplo, os linfócitos T CD8⁺CD28⁻, caracterizadas pelo seu estado imunossenesciente, produzem grandes quantidades de INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 (Bauer e Fuente Mde, 2016). Além disso, vários estudos tem relatado que os macrófagos sofrem mudanças drásticas durante a obesidade, adotando um fenótipo inflamatório, principalmente no tecido adiposo, secretando citocinas como TNF- α e IL-1 β .

Surpreendentemente, além do aumento das citocinas inflamatórias, observamos aumento da secreção de TGF- β pelas PBMC de indivíduos com obesidade em 24 horas. Quando cultivamos PBMC de indivíduos portadores de

obesidade, observamos um maior número de células em apoptose. Há evidências de que a fagocitose de corpos apoptóticos pelos monócitos pode resultar em secreção de citocinas anti-inflamatórias. Assim, um trabalho prévio mostrou que a co-cultura de células apoptóticas com macrófagos resultou em produção de TGF- β e IL-10 (Fadok *et al.*, 1998, Huynh *et al.*, 2002). Na nossa cultura, com o tempo, houve supressão do TGF- β , possivelmente refletido pelo aumento da secreção das citocinas inflamatórias.

A inflamação crônica durante a obesidade é uma condição prolongada onde lesões aos tecidos e tentativas de reparo acontecem simultaneamente, ocasionando remodelação tecidual como aumento de fibrose e, conseqüentemente, disfunção progressiva. Neste contexto, a gravidade da remodelação tecidual determina o prognóstico de doenças consideradas comorbidades da obesidade, como doenças cardiovasculares. Assim, a secreção de mediadores inflamatórios por células imunossenescente ou imunologicamente ativadas impactam na função de tecidos metabólicos como o tecido adiposo, o tecido muscular, o tecido hepático e o tecido cardiovascular, podendo contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas associadas ao envelhecimento (Schafer *et al.*, 2017). Além disso, as citocinas inflamatórias, principalmente a IL-6, são fortes preditores de mortalidade (Franceschi e Campisi, 2014). Um estudo anterior, realizado com indivíduos idosos na Suíça descreveu que o índice de mortalidade nos participantes do estudo foi fracamente associado a parâmetros imunológicos como porcentagem de linfócitos T CD8⁺CD28⁻, mas foi fortemente associado aos níveis de IL-6 circulantes no sangue periférico (Wikby *et al.*, 2005).

A nível celular, a inflamação contribui com o envelhecimento e diminui o potencial regenerativo dos tecidos. Vias de sinalização inflamatórias são integradas com vias de sinalização de nutrientes como p38 MAPK, TGF- β e mTOR, que, por

sua vez, controlam a função mitocondrial e produção de radicais livres. Assim, os mediadores inflamatórios podem ser importantes estressores da mitocôndria e induzir morte celular e senescência (Jurk *et al.*, 2014) . Ainda, o acúmulo prematuro de células senescentes aumenta a sinalização inflamatória e oxidativa, induzindo dano ao DNA e disfunção mitocondrial de maneira parácrina em células adjacentes em diferentes tecidos, criando um ciclo vicioso. Neste contexto, a inflamação crônica na obesidade pode ser responsável pela indução de um envelhecimento sistêmico prematuro (Nelson *et al.*, 2012, Acosta *et al.*, 2013).

Quando se discutem alterações relacionadas a obesidade, um importante fator a ser considerado é a grande heterogeneidade entre os indivíduos. Por exemplo, diferentes níveis na relação entre os índices de gordura visceral e subcutânea podem ter impactos distintos sobre parâmetros moleculares e celulares. Para determinar a presença de obesidade nos indivíduos, diferentes métodos foram desenvolvidos, incluindo a antropometria, a análise de bioimpedância, a densitometria e métodos baseados em imagens (Reilly e Saltiel, 2017). No entanto, mesmo que o IMC seja uma ferramenta imprecisa, é o método mais comumente usado para diagnosticar a obesidade e foi o método utilizado neste estudo. O IMC identifica o sobrepeso e a obesidade com base no peso do indivíduo expresso em quilogramas e dividido pela altura quadrada em metros. Assim, uma grande limitação desse método de classificação é que não se obtém dados relacionados a porcentagem total de gordura de cada indivíduo e aos índices de gordura subcutânea e visceral.

Neste contexto, a presença de tecido adiposo visceral possui maior impacto negativo sobre a homeostase do organismo nos indivíduos portadores de obesidade. Embora os desfechos clínicos associados a obesidade sejam diversos, o número e a gravidade dessas complicações dependem do excesso de gordura em depósitos

internos, como o tecido adiposo visceral abdominal, e dentro e entorno de tecidos normalmente magros, como o coração, fígado e rins (Reilly e Saltiel, 2017). Neste contexto, o tecido adiposo visceral possui grande quantidade de células do sistema imune infiltradas, como os macrófagos. Estes macrófagos possuem importante papel na eliminação de adipócitos mortos do tecido adiposo e exercem forte impacto no metabolismo sistêmico. Assim, a inflamação gerada no tecido adiposo modula a função dos adipócitos localmente e induz uma disfunção metabólica sistêmica que pode gerar comorbidades e agravar o fenótipo de envelhecimento dos indivíduos com obesidade (Castro, 2012).

Quando avaliamos o impacto do plasma de indivíduos com obesidade sem comorbidades e de indivíduos com obesidade com SM, constatamos que não houve diferenças sobre parâmetros de viabilidade, β -galactosidase, produção de espécies reativas e fagocitose nos macrófagos, sugerindo que a obesidade *per se* possui alterações que agravam a condição de saúde do indivíduo. Corroborando com estes dados, estudo prévio demonstrou que PBMC de indivíduos com obesidade possuem regulação positiva da expressão de genes de adipocinas inflamatórias, tanto em obesos normoglicêmicos com em obesos diabéticos (Catalan *et al.*, 2015).

III.2 CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesta tese apoiam a hipótese de que a obesidade é uma patologia associada com a imunossenescência sistêmica prematura. Conseguimos, através de um modelo de cultura celular de PBMC suplementadas *in vitro* com plasma de indivíduos portadores de obesidade induzir alterações associadas a parâmetros de inflamação e senescência, semelhantes a aqueles observados em células de obesos *ex vivo*. As principais alterações que o plasma de indivíduos portadores de obesidade causou em PBMC previamente saudáveis foram a diminuição da viabilidade e o aumento da apoptose, a sinalização de DDR através de H2AFX diminuída, disfunção mitocondrial basal e em relação a produção de ATP, aumento de células senescentes T CD8⁺CD28⁻ e aumento do perfil de secreção de citocinas inflamatórias. Somado a isso, o plasma de indivíduos portadores de obesidade também induziu a expressão de β -galactosidase em macrófagos sem comprometer sua funcionalidade e sem aumentar a produção de ROS. Finalmente, confirmamos a DDR comprometida e a instabilidade genômica em indivíduos portadores de obesidade, bem como a secreção aumentada de mediadores inflamatórios.

Nossos resultados sustentam a hipótese da obesidade como uma patologia sistêmica e dinâmica do indivíduo associada a imunossenescência. Nesse contexto a liberação de indutores que são reconhecidos por sensores celulares induzem cascatas de sinalização e mediadores que agem em diferentes tecidos e situam a obesidade em níveis mais próximos ao envelhecimento e ao desenvolvimento de processos neoplásicos.

III.3 PERSPECTIVAS

1. Complementar o capítulo II com a análise do fenótipo secretor inflamatório dos macrófagos ativados (CBA);
2. Complementar o capítulo III com análises de imunossenescência nas PBMC de indivíduos portadores de obesidade, avaliando a porcentagem de linfócitos T negativos para CD28 e positivos para PD-1, a secreção de IL-6 pelos linfócitos T CD8⁺CD28⁻PD-1⁺, a fosforilação de H2AFX na cinética de reparo de dano ao DNA, dados complementares associados à sinalização por apoptose como caspase 3, PUMA, BAX e BCL-2, função mitocondrial e níveis de produção de ATP, quantificação de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e de migração, fagocitose e NADPH oxidase em monócitos;
3. Realizar experimentos de perda e ganho de função do gene H2AFX para determinar a real contribuição de H2AFX no contexto da obesidade.

REFERÊNCIAS

- Acosta, J. C., *et al.* (2013). "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence." Nat Cell Biol **15**(8): 978-990.
- Altieri, P., *et al.* (2012). "Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PPARdelta activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PPARdelta and Bcl6." PLoS One **7**(9): e46126.
- Aykanat, B., *et al.* (2016). "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal epithelial cells of children with chronic kidney disease." Arh Hig Rada Toksikol **67**(4): 317-325.
- Baker, D. J., *et al.* (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." Nature **479**(7372): 232-236.
- Barbe-Tuana, F. M., *et al.* (2016). "Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease." Rev Bras Psiquiatr **38**(4): 281-286.
- Bassing, C. H., *et al.* (2002). "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8173-8178.
- Bassing, C. H., *et al.* (2003). "Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors." Cell **114**(3): 359-370.
- Bauer, M. E. e Fuente Mde, L. (2016). "The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence." Mech Ageing Dev **158**: 27-37.
- Beausejour, C. M., *et al.* (2003). "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways." EMBO J **22**(16): 4212-4222.
- Becker, M., *et al.* (2015). "Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease." Sci Rep **5**: 13351.
- Ben-Porath, I. e Weinberg, R. A. (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-976.
- Bernadotte, A., *et al.* (2016). "Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence." Ageing (Albany NY) **8**(1): 3-11.
- Bernardes de Jesus, B. e Blasco, M. A. (2012). "Assessing cell and organ senescence biomarkers." Circ Res **111**(1): 97-109.
- Blackburn, E. H. e Gall, J. G. (1978). "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena." J Mol Biol **120**(1): 33-53.
- Brand, M. D. (2016). "Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling." Free Radic Biol Med **100**: 14-31.
- Brand, M. D. e Nicholls, D. G. (2011). "Assessing mitochondrial dysfunction in cells." Biochem J **435**(2): 297-312.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 685-705.

- Campisi, J. e d'Adda di Fagagna, F. (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.
- Castro, M. D. L. F. a. N. M. D. (2012). "Obesity as a Model of Premature Immunosenescence" Current Immunology Reviews **8**: 63-75
- Catalan, V., *et al.* (2015). "Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin." Genes Nutr **10**(3): 460.
- Celeste, A., *et al.* (2003a). "H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility." Cell **114**(3): 371-383.
- Celeste, A., *et al.* (2003b). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." Nat Cell Biol **5**(7): 675-679.
- Celeste, A., *et al.* (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." Science **296**(5569): 922-927.
- Cerda, C., *et al.* (2014). "Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis." Adv Exp Med Biol **824**: 5-17.
- Chandek, C. e Mooi, W. J. (2010). "Oncogene-induced cellular senescence." Adv Anat Pathol **17**(1): 42-48.
- Chang, F., *et al.* (2003). "Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)." Int J Oncol **22**(3): 469-480.
- Chebel, A., *et al.* (2009). "Telomere uncapping during in vitro T-lymphocyte senescence." Aging Cell **8**(1): 52-64.
- Chen, A., *et al.* (2015a). "The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes." Med Sci Monit Basic Res **21**: 86-95.
- Chen, H., *et al.* (2015b). "Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(44): E5936-5943.
- Chen, Q. e Ames, B. N. (1994). "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4130-4134.
- Childs, B. G., *et al.* (2014). "Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?" EMBO Rep **15**(11): 1139-1153.
- Childs, B. G., *et al.* (2015). "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." Nat Med **21**(12): 1424-1435.
- Coppe, J. P., *et al.* (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.
- Correia-Melo, C., *et al.* (2016). "Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype." EMBO J **35**(7): 724-742.

Czepielewski, L. S., *et al.* (2016). "Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging." Schizophr Res **174**(1-3): 39-42.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response." Nat Rev Cancer **8**(7): 512-522.

De la Fuente, M. e Miquel, J. (2009). "An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging." Curr Pharm Des **15**(26): 3003-3026.

Debacq-Chainiaux, F., *et al.* (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." Nat Protoc **4**(12): 1798-1806.

Di Micco, R., *et al.* (2011). "Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer." Nat Cell Biol **13**(3): 292-302.

Dicker, D., *et al.* (2013). "Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection." Obes Facts **6**(2): 146-151.

Edgar, D. e Trifunovic, A. (2009). "The mtDNA mutator mouse: Dissecting mitochondrial involvement in aging." Aging (Albany NY) **1**(12): 1028-1032.

Effros, R. B., *et al.* (1996). "Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis." AIDS **10**(8): F17-22.

Fadok, V. A., *et al.* (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." J Clin Invest **101**(4): 890-898.

Filippi-Chiela, E. C.; Oliveira, M. M.; Jurkovski, B.; Callegari-Jacques, S. M.; da Silva, V. D.; Lenz, G. Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. PLoS One, 7(8):e42522, 2012.

Fontana, L., *et al.* (2010). "Extending healthy life span--from yeast to humans." Science **328**(5976): 321-326.

Fragkos, M., *et al.* (2009). "H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway." Mol Cell Biol **29**(10): 2828-2840.

Franceschi, C., *et al.* (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci **908**: 244-254.

Franceschi, C. e Campisi, J. (2014). "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69 Suppl 1**: S4-9.

Freund, A., *et al.* (2010). "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences." Trends Mol Med **16**(5): 238-246.

Frezza, E. E., *et al.* (2006). "Influence of obesity on the risk of developing colon cancer." Gut **55**(2): 285-291.

Galic, S., *et al.* (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 129-139.

- Gamberg, J., *et al.* (2004). "Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression." Immunol Cell Biol **82**(1): 38-46.
- Garrison, C. B., *et al.* (2017). "Proteomic Analysis, Immune Dysregulation, and Pathway Interconnections with Obesity." J Proteome Res **16**(1): 274-287.
- Gartel, A. L. e Radhakrishnan, S. K. (2005). "Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences." Cancer Res **65**(10): 3980-3985.
- Gems, D. e Partridge, L. (2013). "Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts." Annu Rev Physiol **75**: 621-644.
- Georgoulis, A., *et al.* (2017). "Genome Instability and gammaH2AX." Int J Mol Sci **18**(9).
- Gheorghe, A., *et al.* (2017). "Oxidative stress and immunosenescence in spleen of obese mice can be reversed by 2-hydroxyoleic acid." Exp Physiol **102**(5): 533-544.
- Gonzalez-Muniesa, P., *et al.* (2017). "Obesity." Nat Rev Dis Primers **3**: 17034.
- Goodarzi, A. A., *et al.* (2008). "ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin." Mol Cell **31**(2): 167-177.
- Goronzy, J. J., *et al.* (2001). "Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals." J Virol **75**(24): 12182-12187.
- Green, D. R., *et al.* (2011). "Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging." Science **333**(6046): 1109-1112.
- Gregor, M. F. e Hotamisligil, G. S. (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity." Annu Rev Immunol **29**: 415-445.
- Gupta, S. (2005). "Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging." Immunol Rev **205**: 114-129.
- Hall, B. M., *et al.* (2017). "p16(Ink4a) and senescence-associated beta-galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli." Aging (Albany NY) **9**(8): 1867-1884.
- Hall, B. M., *et al.* (2016). "Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and beta-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells." Aging (Albany NY) **8**(7): 1294-1315.
- Han, T. S. e Lean, M. E. (2016). "A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease." JRSM Cardiovasc Dis **5**: 2048004016633371.
- Harman, D. (1965). "The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels." J Gerontol **20**: 151-153.
- Havelek, R., *et al.* (2013). "Ionizing radiation induces senescence and differentiation of human dental pulp stem cells." Folia Biol (Praha) **59**(5): 188-197.
- Hayflick, L. e Moorhead, P. S. (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.
- Hintzsche, H., *et al.* (2017). "Fate of micronuclei and micronucleated cells." Mutat Res **771**: 85-98.

- Hiona, A., *et al.* (2010). "Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice." PLoS One **5**(7): e11468.
- Hunsche, C., *et al.* (2016). "Impaired Immune Response in Old Mice Suffering from Obesity and Premature Immunosenescence in Adulthood." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **71**(8): 983-991.
- Huttunen, R. e Syrjanen, J. (2013). "Obesity and the risk and outcome of infection." Int J Obes (Lond) **37**(3): 333-340.
- Huynh, M. L., *et al.* (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." J Clin Invest **109**(1): 41-50.
- Jurk, D., *et al.* (2014). "Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice." Nat Commun **2**: 4172.
- Karownik-Lewinska, M., *et al.* (2012). "Direct contribution of obesity to oxidative damage to macromolecules." Neuro Endocrinol Lett **33**(4): 453-461.
- Karonova, T., *et al.* (2018). "Serum 25(OH)D and adipokines levels in people with abdominal obesity." J Steroid Biochem Mol Biol **175**: 170-176.
- Kim, J. A., *et al.* (2007). "Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals." J Cell Biol **178**(2): 209-218.
- Kobayashi, J., *et al.* (2002). "NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain." Curr Biol **12**(21): 1846-1851.
- Kracikova, M., *et al.* (2013). "A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis." Cell Death Differ **20**(4): 576-588.
- Lawless, C., *et al.* (2012). "A stochastic step model of replicative senescence explains ROS production rate in ageing cell populations." PLoS One **7**(2): e32117.
- Li, S., *et al.* (2009). "Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet." Circ Res **105**(11): 1072-1082.
- Liu, Z., *et al.* (2015). "The association between overweight, obesity and ovarian cancer: a meta-analysis." Jpn J Clin Oncol **45**(12): 1107-1115.
- Livak, K.J. e Schmittgen, T.D.(2001)."Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lopez-Otin, C., *et al.* (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-1217.
- Luperini, B. C., *et al.* (2015). "Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women." Mutat Res **776**: 111-117.
- Marechal, A. e Zou, L. (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(9).

- Matsumoto, R., *et al.* (2015). "Accelerated Telomere Shortening in Acromegaly; IGF-I Induces Telomere Shortening and Cellular Senescence." PLoS One **10**(10): e0140189.
- McElhaney, J. E. e Effros, R. B. (2009). "Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults?" Curr Opin Immunol **21**(4): 418-424.
- Minamino, T., *et al.* (2009). "A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance." Nat Med **15**(9): 1082-1087.
- Miwa, S., *et al.* (2014). "Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice." Nat Commun **5**: 3837.
- Moiseeva, O., *et al.* (2009). "Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence." Mol Cell Biol **29**(16): 4495-4507.
- Mombach, J. C., *et al.* (2014). "Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint." BMC Genomics **15 Suppl 7**: S7.
- Monteiro, J., *et al.* (1996). "Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts." J Immunol **156**(10): 3587-3590.
- Monteiro, R. e Azevedo, I. (2010). "Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome." Mediators Inflamm **2010**.
- Mundstock, E., *et al.* (2015). "Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis." Obesity (Silver Spring) **23**(11): 2165-2174.
- Munoz-Espin, D. e Serrano, M. (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(7): 482-496.
- Murga, M., *et al.* (2007). "Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response." J Cell Biol **178**(7): 1101-1108.
- Myers, M. G., Jr., *et al.* (2010). "Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect." Trends Endocrinol Metab **21**(11): 643-651.
- Nelson, G., *et al.* (2012). "A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence." Aging Cell **11**(2): 345-349.
- Nishimoto, S., *et al.* (2016). "Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance." Sci Adv **2**(3): e1501332.
- NMA - Nuclear Morphometric Analysis spreadsheets. Disponíveis em <<http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>> Acesso em 15 de janeiro, 2018.
- Oishi, Y. e Manabe, I. (2016). "Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases." NPJ Aging Mech Dis **2**: 16018.
- Parisi, M. M., *et al.* (2017). "Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation." Obesity (Silver Spring) **25**(9): 1523-1531.
- Passos, J. F., *et al.* (2010). "Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence." Mol Syst Biol **6**: 347.

Pawelec, G. (2017). "Does the human immune system ever really become "senescent"?" F1000Res **6**.

Peterson, G. L. (1979). "Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randhal." Annal Biochem **100**(2): 201-20.

Phelouzat, M. A., *et al.* (1996). "Excessive apoptosis of mature T lymphocytes is a characteristic feature of human immune senescence." Mech Ageing Dev **88**(1-2): 25-38.

Picarelli, M. M., *et al.* (2017). "Arterial stiffness by oscillometric device and telomere length in juvenile idiopathic arthritis with no cardiovascular risk factors: a cross-sectional study." Pediatr Rheumatol Online J **15**(1): 34.

Pinti, M., *et al.* (2016). "Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination." Eur J Immunol **46**(10): 2286-2301.

Ponnappan, S. e Ponnappan, U. (2011). "Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions." Antioxid Redox Signal **14**(8): 1551-1585.

Prattichizzo, F., *et al.* (2016). "Senescence associated macrophages and "macroph-aging": are they pieces of the same puzzle?" Aging (Albany NY) **8**(12): 3159-3160.

Qian, Y. e Chen, X. (2013). "Senescence regulation by the p53 protein family." Methods Mol Biol **965**: 37-61.

Rayess, H., *et al.* (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." Int J Cancer **130**(8): 1715-1725.

Redinger, R. N. (2007). "The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations." Gastroenterol Hepatol (N Y) **3**(11): 856-863.

Reilly, S. M. e Saltiel, A. R. (2017). "Adapting to obesity with adipose tissue inflammation." Nat Rev Endocrinol **13**(11): 633-643.

Rizzo, L. B., *et al.* (2013). "Immunosenescence is associated with human cytomegalovirus and shortened telomeres in type I bipolar disorder." Bipolar Disord **15**(8): 832-838.

Rodier, F. e Campisi, J. (2011). "Four faces of cellular senescence." J Cell Biol **192**(4): 547-556.

Sahin, E., *et al.* (2011). "Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise." Nature **470**(7334): 359-365.

Salminen, A., *et al.* (2012). "Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes." Aging (Albany NY) **4**(3): 166-175.

Scarpato, R., *et al.* (2011). "Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test." FASEB J **25**(2): 685-693.

Schafer, M. J., *et al.* (2017). "Cellular senescence: Implications for metabolic disease." Mol Cell Endocrinol **455**: 93-102.

Schmidt, F. M., *et al.* (2015). "Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity." PLoS One **10**(3): e0121971.

- Shah, N. R. e Mahmoudi, M. (2015). "The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review." J Mol Cell Cardiol **86**: 147-157.
- Sharma, A., *et al.* (2012). "Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage." Methods Mol Biol **920**: 613-626.
- Sheridan, P. A., *et al.* (2012). "Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans." Int J Obes (Lond) **36**(8): 1072-1077.
- Shirakawa, K., *et al.* (2016). "Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue." J Clin Invest **126**(12): 4626-4639.
- Sirbu, B. M. e Cortez, D. (2013). "DNA damage response: three levels of DNA repair regulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(8): a012724.
- Spallarossa, P., *et al.* (2009). "Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(6): H2169-2181.
- Spielmann, G., *et al.* (2014). "Excess body mass is associated with T cell differentiation indicative of immune ageing in children." Clin Exp Immunol **176**(2): 246-254.
- Stefanou, D. T., *et al.* (2015). "Aberrant DNA damage response pathways may predict the outcome of platinum chemotherapy in ovarian cancer." PLoS One **10**(2): e0117654.
- Stockl, P., *et al.* (2006). "Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts." Exp Gerontol **41**(7): 674-682.
- Stockl, P., *et al.* (2007). "Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells." Free Radic Biol Med **43**(6): 947-958.
- Storer, M. e Keyes, W. M. (2017). "Detection of Senescence Markers During Mammalian Embryonic Development." Methods Mol Biol **1534**: 199-210.
- Strioga, M., *et al.* (2011). "CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease." Immunology **134**(1): 17-32.
- Sulli, G., *et al.* (2012). "Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer." Nat Rev Cancer **12**(10): 709-720.
- Tchkonia, T., *et al.* (2010). "Fat tissue, aging, and cellular senescence." Aging Cell **9**(5): 667-684.
- Tenorio, N. M., *et al.* (2013). "The influence of sleep deprivation and obesity on DNA damage in female Zucker rats." Clinics (Sao Paulo) **68**(3): 385-389.
- Valenzuela, H. F. e Effros, R. B. (2002). "Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus." Clin Immunol **105**(2): 117-125.
- Van Raamsdonk, J. M. e Hekimi, S. (2009). "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **5**(2): e1000361.

- Vasconcelos-Moreno, M. P., *et al.* (2017). "Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging." Int J Neuropsychopharmacol **20**(6): 445-454.
- Vergoni, B., *et al.* (2016). "DNA Damage and the Activation of the p53 Pathway Mediate Alterations in Metabolic and Secretory Functions of Adipocytes." Diabetes **65**(10): 3062-3074.
- Vijg, J. e Campisi, J. (2008). "Puzzles, promises and a cure for ageing." Nature **454**(7208): 1065-1071.
- Wang, C., *et al.* (2010). "Adult-onset, short-term dietary restriction reduces cell senescence in mice." Aging (Albany NY) **2**(9): 555-566.
- Wang, W., *et al.* (2002). "AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR." Mol Cell Biol **22**(10): 3425-3436.
- Wang, W., *et al.* (2003). "Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function." J Biol Chem **278**(29): 27016-27023.
- Weng, N., *et al.* (1997). "Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation." J Immunol **158**(7): 3215-3220.
- Wikby, A., *et al.* (2005). "An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **60**(5): 556-565.
- Wikby, A., *et al.* (2002). "Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study." Exp Gerontol **37**(2-3): 445-453.
- Wiley, C. D., *et al.* (2016). "Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype." Cell Metab **23**(2): 303-314.
- Wollenhaupt-Aguiar, B., *et al.* (2016). "Reduced Neurite Density in Neuronal Cell Cultures Exposed to Serum of Patients with Bipolar Disorder." Int J Neuropsychopharmacol.
- Yee, C., *et al.* (2014). "The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*." Cell **157**(4): 897-909.
- Yoon, Y. S., *et al.* (2003). "Complex II defect via down-regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest." J Biol Chem **278**(51): 51577-51586.
- Young, k., *et al.* (2016). "Progressive alterations in multipotent hematopoietic progenitors underlie lymphoid cell loss in aging". J Exp Med **213**(11): 2259-2267.
- Zediak, V. P., *et al.* (2007). "Multiple prethymic defects underlie age-related loss of T progenitor competence". Blood **110**(4): 1161-7.

Ziegler, D. V., *et al.* (2015). "Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging." Aging Cell **14**(1): 1-7.

ANEXOS

APROVAÇÃO CEP PUC

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do comprimento dos telômeros em pacientes obesos com indicação de tratamento cirúrgico e sua evolução após a cirurgia bariátrica

Pesquisador: Alexandre Vontobel Padoin

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 29576014.4.1001.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 760.537

Data da Relatoria: 31/08/2014

Apresentação do Projeto:

Sem ressalvas.

Objetivo da Pesquisa:

Sem ressalvas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem ressalvas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem ressalvas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem ressalvas.

Recomendações:

Recomenda-se que o endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS seja atualizado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505

Porto Alegre /RS - Brasil - CEP: 90619-900

Fone/Fax: (51) 3320.3345

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 760.537

E-mail: cep@pucls.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 21 de Agosto de 2014

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

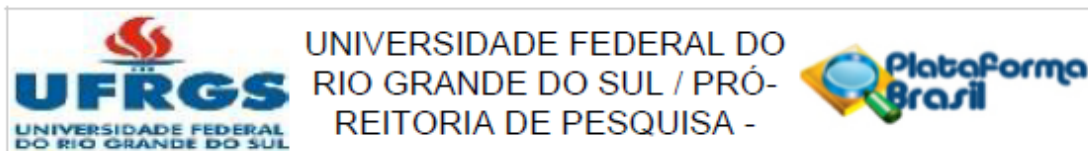
Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucls.br

APROVAÇÃO CEP UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do comprimento de telômeros em diferentes populações celulares de obesos mórbidos

Pesquisador: Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26793114.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 640.817

Data da Relatoria: 20/03/2014

Apresentação do Projeto:

A obesidade é uma desordem definida pelo índice de massa corporal (IMC), relacionada diretamente com a porcentagem de gordura corporal total. Além de contribuir para o surgimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade acelera os processos celulares do envelhecimento, reduzindo a expectativa de vida. Este estudo, no contexto de uma dissertação de mestrado, avaliará o tamanho de telômeros em indivíduos obesos.

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto visa agregar aos estudos com indivíduos obesos dados sobre o encurtamento dos telômeros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios adequadamente apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Possui mérito.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE apresentado adequadamente

Concordância do ambulatório de Cirurgia Bariátrica do Hospital São Lucas da PUCRS presente.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 640.817

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado e não apresentando pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

PORTO ALEGRE, 08 de Maio de 2014

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

PRÊMIO RECEBIDOS ATRAVÉS DESTA TESE DE DOUTORADO

2017 – Vencedora do Prêmio BD Biosciences Pesquisador SBI, categoria Jovem Talento, promovido em parceria entre a BD Biosciences e a Sociedade Brasileira de Imunologia, durante o XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, em Salvador/BA.

2017 – Menção Honrosa pela apresentação de pôster durante a XXXII Reunião Anual da FESBE, em Campos do Jordão, SP.

2015 – Finalista do Prêmio BD Biosciences Pesquisador SBI, categoria Jovem Talento, promovido em parceria entre a BD Biosciences e a Sociedade Brasileira de Imunologia, durante o XL Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, em Guarujá/SP.

TRABALHOS PUBLICADOS COMO COAUTORA DURANTE O DOUTORAMENTO

1. FERRARI, P.; **PARISI, M. M.**; COLOMBO, R. ; BECKER, M. ; FRIES, G. ; ASCOLI, B. ; GEA, L. ; SANTANNA, M. K. ; KAPCZINSKY, F. ; KLAMT, F. ; GUMA, F. T. C. R. ; ROSA, A. R. ; BARBE-TUANA, FLORENCIA. Depression and mania induce pro-inflammatory activation of macrophages following application of serum from individuals with bipolar disorder. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2017.
2. BARBE-TUANA, FLORENCIA; **PARISI, M. M.** ; PANIZZUTTI, B.; FRIES, GABRIEL R. ; GRUN, LUCAS K.; KAPCZINSKI, FLÁVIO; BERK, MICHAEL; GAMA, CLARISSA S. ; GUMA, FÁTIMA T.; ROSA, ADRIANE R. Response letter to comment: Analyzing leukocyte telomere length in early and late stages of patients with bipolar disorder: a comment on Barbé-Tuana et al. *REVISTA BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA*, v. xx, p. xx, 2017.
3. DENARDIN, CRISTIANE C. ; MARTINS, LEO A. M. ; **PARISI, Mariana M.** ; VIEIRA, MOEMA QUEIROZ ; TERRA, SILVIA R. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; BOROJEVIC, RADOVAN ; VIZZOTTO, MÁRCIA ; EMANUELLI, TATIANA ; GUMA, FÁTIMA COSTA RODRIGUES . Autophagy induced by purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. *CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY*, v. 33, p. 197-206, 2017.
4. SCHWEINBERGER, BRUNA M. ; RODRIGUES, ANDRÉ F. ; TURCATEL, ELIAS ; PIEROZAN, PAULA ; PETTENUZZO, LETICIA F. ; GRINGS, MATEUS ; SCAINI, GISELLI ; **PARISI, Mariana M.** ; LEIPNITZ, GUILHIAN ; STRECK, EMILIO L. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; WYSE, ANGELA T. S. . Maternal Hypermethioninemia Affects Neurons Number, Neurotrophins Levels, Energy Metabolism, and Na⁺,K⁺-ATPase Expression/Content in Brain of Rat Offspring. *MOLECULAR NEUROBIOLOGY*, v. x, p. x, 2017.
5. VASCONCELOS-MORENO, MIRELA PAIVA ; FRIES, GABRIEL RODRIGO ; GUBERT, CAROLINA ; DOS SANTOS, BÁRBARA TIETBÖHL MARTINS QUADROS ; FIJTMAN, ADAM ; SARTORI, JULIANA ; FERRARI, PAMELA ; GRUN, LUCAS KICH ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; GUMA, FÁTIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA MARIA ; KAPCZINSKI, FLÁVIO ; ROSA, ADRIANE RIBEIRO ; YATHAM, LAKSHMI N. ; KAUER-SANT?ANNA, MARCIA . Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY*, v. 20, p. 445-454, 2017.
6. OTERO, JULIANA SOARES ; HIRSCH, GABRIELA ELISA ; KLAFKE, JONATAS ZENI ; PORTO, FERNANDO GARCEZ ; DE ALMEIDA, AMANDA SPRING ; NASCIMENTO, SABRINA ; SCHMIDT, ALINE ; DA SILVA, BRENDA ; PEREIRA, ROBERTA LELIS DIAS ; JASKULSKI, MÔNICA ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; DOS SANTOS GUARDA, NAIARA ; MORESCO, RAFAEL NOAL ; AITA, CARLOS ALBERTO MAYORA ; VIECILI,

- PAULO RICARDO NAZÁRIO . Inhibitory effect of Campomanesia xanthocarpa in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid. THROMBOSIS RESEARCH, v. 154, p. 42-49, 2017.
7. BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; **PARISI, Mariana M.** ; PANIZZUTTI, BRUNA S. ; FRIES, GABRIEL R. ; GRUN, LUCAS K. ; GUMA, FÁTIMA T. ; KAPCZINSKI, FLÁVIO ; BERK, MICHAEL ; GAMA, CLARISSA S. ; ROSA, ADRIANE R. . Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease. REVISTA BRASILEIRA DE PSQUIATRIA, v. 38, p. 281-286, 2016.
 8. PIEROZAN, PAULA; BIASIBETTI, HELENA ; SCHMITZ, FELIPE ; ÁVILA, HELENA ; **PARISI, Mariana M.** ; BARBE-TUANA, FLORENCIA ; WYSE, ANGELA T.S. ; PESSOA-PUREUR, REGINA . Quinolinic acid neurotoxicity: Differential roles of astrocytes and microglia via FGF-2-mediated signaling in redox-linked cytoskeletal changes. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR CELL RESEARCH, v. 1863, p. 3001-3014, 2016.
 9. RODRIGUES, ANDRÉ FELIPE ; BIASIBETTI, HELENA ; ZANOTTO, BRUNA STELA ; SANCHES, EDUARDO FARIAS ; PIEROZAN, PAULA ; SCHMITZ, FELIPE ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; NETTO, CARLOS ALEXANDRE ; WYSE, ANGELA T.S. . Intracerebroventricular d-galactose administration impairs memory and alters activity and expression of acetylcholinesterase in the rat. INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE, v. 50, p. 1-6, 2016.
 10. BECKER, MATHEUS ; DE BASTIANI, MARCO A. ; **PARISI, Mariana M.** ; GUMA, FÁTIMA T. C. R. ; MARKOSKI, MELISSA M. ; CASTRO, MAURO A. A. ; KAPLAN, MARK H. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; KLAMT, FÁBIO . Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. Scientific Reports, v. 5, p. 13351, 2015.
 11. HIRSCH, GABRIELA E. ; **PARISI, Mariana M.** ; MARTINS, LEO A.M. ; ANDRADE, CLAUDIA M.B. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; GUMA, FÁTIMA T.C.R. . γ -oryzanol reduces caveolin-1 and PCGEM1 expression, markers of aggressiveness in prostate cancer cell lines. The Prostate (Print), v. 75, p. n/a-n/a, 2015.
 12. MUNDSTOCK, EDUARDO ; ZATTI, HELEN ; LOUZADA, FERNANDA MATTOS ; OLIVEIRA, SUELEN GOECKS ; GUMA, FÁTIMA T.C.R. ; **PARIS, MARIANA MIGLIORINI** ; RUEDA, ANGÉLICA BARBA ; MACHADO, DENISE GREFF ; STEIN, RENATO T. ; JONES, MARCUS HERBERT ; SARRIA, EDGAR E. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA M. ; MATTIELLO, RITA . Effects of physical activity in telomere length: Systematic review and meta-analysis. Ageing Research Reviews (Print), v. 22, p. 72-80, 2015
 13. SCHMITZ, FELIPE; PIEROZAN, PAULA ; RODRIGUES, ANDRÉ F. ; BIASIBETTI, HELENA ; COELHO, DANIELLA M. ; MUSSULINI, BEN HUR ; PEREIRA, MERY S. L. ; **PARISI, Mariana M.** ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; DE OLIVEIRA, DIOGO L. ; VARGAS, CARMEN R. ; WYSE, ANGELA T. S. .

Chronic Treatment with a Clinically Relevant Dose of Methylphenidate Increases Glutamate Levels in Cerebrospinal Fluid and Impairs Glutamatergic Homeostasis in Prefrontal Cortex of Juvenile Rats. *Molecular Neurobiology*, v. 53, p. 2384-2396, 2015.

14. KLAFKE, J. Z. ; PORTO, F. G. ; ALMEIDA, A. S. ; **PARISI, M. M.** ; HIRSCH, G. E. ; TREVISAN, G. ; VIECILLI, P. R. N. . Biomarkers of Subclinical Atherosclerosis and Natural Products as Complementary Alternative Medicine. *Current Pharmaceutical Design (Print)*, v. 22, p. 372-382, 2015.
15. KLAFKE, JONATAS ZENI ; PEREIRA, ROBERTA LELIS DIAS ; HIRSCH, GABRIELA ELISA ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; PORTO, FERNANDO GARCEZ ; DE ALMEIDA, AMANDA SPRING ; RUBIN, FABIANE HORBACH ; SCHMIDT, ALINE ; BEUTLER, HENRIQUE ; NASCIMENTO, SABRINA ; TREVISAN, GABRIELA ; BRUSCO, INDIARA ; DE OLIVEIRA, SARA MARCHESAN ; DUARTE, MARTA MARIA MEDEIROS FRESCURA ; DUARTE, THIAGO ; VIECILI, PAULO RICARDO NAZÁRIO . Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. *PHYTOMEDICINE*, v. x, p. x, 2015.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS DURANTE O DOUTORAMENTO

1.

SERAFIN, S. ; FERRARI, PAMELA ; COLOMBO, R. ; GEA, L. ; **PARISI, Mariana M.** ; BECKER, M. ; ASCOLI, B. ; FRIES, GABRIEL R. ; SANTANNA, M. K. ; KAPCZINSKY, F. ; KLAMT, FÁBIO; GUMA, FÁTIMA T. ; ROSA, ADRIANE R. ; BARBE-TUANA, F. M. . Serum of bipolar patients induces pro-inflammatory activation of macrophages. In: 25th European Congress of Psychiatry / European Psychiatry, 2017, Nice. Annals of 25th European Congress of Psychiatry / European Psychiatry, 2017. v. 41S. p. S106-S169.

2.

GRUN, L. K. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; **PARISI, M. M.** ; MEIRELES, L. V. M. ; BORTOLIN, R. C. ; LIMA, V. P. ; ALVES, L. B. ; PADOIN, A. V. ; MOTTIN, C. ; MATTIELLO, RITA ; JONES, M. H. ; MOREIRA, J. C. F. ; KLAMT, FÁBIO ; GUMA, FÁTIMA T. ; BARBE-TUANA, FLORENCIA . Telomere homeostasis, Shelterin components and dyskerin 1 dysregulation in PBMC from individuals with obesity and its relation to pro-oxidative and pro-inflammatory status. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos Do Jordão. Anais da XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017.

3.

PARISI, M. M.; GRUN, LUCAS K. ; LAVANDOSKI, P. ; LIMA, V. P. ; ROSA, H. ; MOREIRA, J. C. F. ; MOTTIN, C. ; KLAMT, F. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. V. ; GUMA, FÁTIMA T. ; BARBE-TUANA, FLORENCIA . Impaired DNA damage repair and augmented apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells from individuals with obesity. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017, Campos do Jordão. Anais do XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017.

4.

LAVANDOSKI, P. ; **PARISI, M. M.** ; GRUN, L. K. ; ALVES, L. B. ; BRISTOT, I. J. ; MATTIELLO, RITA ; MOTTIN, C. ; KLAMT, F. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. V. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . IMMUNOSENESCENCE INDUCED BY PLASMA FROM INDIVIDUALS WITH OBESITY CAUSED CELL SIGNALING DYSFUNCTION AND INFLAMMATION. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE,, 2017, Campos do Jordão. Anais XXXII Reunião Anual da FeSBE, 2017.

5.

PARISI, M. M.; BECKER, MATHEUS ; ASCOLI, B. ; FERRARI, P. ; COLOMBO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; KLAMT, F. ; FRIES, G. ; ROSA, A. R. ; BARBÉ-TUANA, F. M. . TNF-alfa contributes to depression in bipolar disorder. In: 45º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2016, Natal. Anais da 45º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2016.

6.

FERRARI, P. ; **PARISI, M. M.** ; COLOMBO, R. ; BECKER, M. ; FRIES, G. ; ASCOLI, B. ; GEA, L. ; SANTANNA, M. K. ; KAPCZINSKY, F. ; KLAMT, F. ; GUMA, FÁTIMA T. C. R. ; BARBE-TUANA, F. M. ; ROSA, A. R. . PERIPHERAL CYTOKINES MODULATE MACROPHAGE POLARIZATION IN BIPOLAR DISORDER. In: World Congress on Brain, Behavior and Emotions, 2016, Buenos Aires. Annals of World Congress on Brain, Behavior and Emotions, 2016.

7.

ROSA JUNIOR, N. T. ; GRUN, L. K. ; **PARISI, M. M.** ; LAVANDOSKI, P. ; ALVES, L. B. ; PADOIN, A. V. ; MOTTIN, C. ; JONES, M. H. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA . Aumento na expressão das proteínas do Complexo Shelterin e encurtamento de telômeros em indivíduos portadores de obesidade. In: 36º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2016, Porto Alegre. Anais da 36º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2016.

8.

BARBÉ-TUANA, F. M. ; LEAL, L. ; GRUN, L. K. ; STAPENHORST, F. ; **PARISI, M. M.** ; LAVANDOSKI, P. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; MATTIELLO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; KLAMT, F. ; MOTTIN, C. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. V. . Telomere shortening and mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from morbid obese patients. In: Cold Spring Harbor Laboratory Telomeres & Telomerase Meeting, 2015, New York. Annals of Cold Spring Harbor Laboratory Telomeres & Telomerase Meeting, 2015.

9.

SCHMITZ, F. ; PIEROZAN, P. ; RODRIGUES, A. F. ; BIASIBETTI, H. ; COELHO, D. M. ; MUSSOLINI, B. H. ; PERERIA, M. L. S. ; **PARISI, M. M.** ; BARBE-TUANA, F. M. ; DE OLIVEIRA, DIOGO L. ; VARGAS, C. R. ; WYSE, ANGELA T. S. . CHRONIC TREATMENT WITH METHYLPHENIDATE INCREASES GLUTAMATE LEVELS IN CEREBROSPINAL FLUID AND IMPAIRS GLUTAMATERGIC HOMEOSTASIS IN PREFRONTAL CORTEX OF JUVENILE RATS. In: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015, Foz Do Iguaçu. Annals of International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015.

10.

LAVANDOSKI, P. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; GRUN, L. K. ; ALVES, L. B. ; STAPENHORST, F. ; **PARISI, M. M.** ; MATTIELLO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; KLAMT, F. ; MOTTIN, C. ; JONES, M. H. ; PADOIN, A. V. ; BARBE-TUANA, F. M. . TELOMERE SHORTENING AND HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH MORBID OBESITY. In: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015, Foz do Iguaçu. Annals of International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015.

11.

PARISI, M. M.; FRIES, G. ; PANIZZUTTI, B. ; GRUN, L. K. ; GUMA, F. T. C. R. ; KAPCZINSKY, F. ; GAMA, C. S. ; ROSA, A. R. ; BARBE-TUANA, F. M. . SHORT TELOMERES IN SUBJECTS WITH REMITTED BIPOLAR DISORDER. In: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015, Foz do Iguaçu. Annals of International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015.

12.

GRUN, L. K. ; PITREZ, P. ; **PARISI, M. M.** ; MATTIELLO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; PINTO, L. ; STEIN, R. ; JONES, M. H. ; BARBE-TUANA, F. M. . SHORTER TELOMERES IN SEVERE ASTHMATIC CHILDREN. In: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015, Foz do Iguaçu. Annals of International Union of Biochemistry and Molecular Biology Congress, 2015.

13.

PORTO, F. G. ; ALMEIDA, A. S. ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; HIRSCH, G. E. ; TREVISAN, G. ; SILVIA, B. ; NASCIMENTO, S. ; SCHMIDT, A. ; VIECILLI, P. R. N. . Novos Biomarcadores em aterosclerose Subclínica. In: VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2015, Novo Hamburgo. Anais do VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2015.

14.

PORTO, F. G. ; ALMEIDA, A. S. ; **PARISI, M. M.** ; HIRSCH, G. E. ; TREVISAN, G. ; SILVIA, B. ; NASCIMENTO, S. ; VIECILLI, P. R. N. ; KLAFKE, J. Z. . Uso de medicina alternativa na aterosclerose subclínica. In: VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2015, Novo Hamburgo. Anais do VIII Congresso Internacional de Bioanálises, XI Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2015.

15.

ROSA, A. R. ; BARBE-TUANA, F. M. ; **PARISI, M. M.** ; FRIES, G. ; PANIZZUTTI, B. ; GUMA, FÁTIMA T. C. R. ; KAPCZINSKY, F. ; GAMA, C. S. . Short telomeres in subjects with remitted bipolar disorder. In: European College of Neuropsychopharmacology, 2015. Annals of European College of Neuropsychopharmacology, 2015.

16.

LAVANDOSKI, P. ; ROSA JUNIOR, N. T. ; GRUN, L. K. ; STAPENHORST, F. ; ALVES, L. B. ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; MATTIELLO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; KLAMT, F. ; BARBE-TUANA, F. M. . Encurtamento telomérico e atividade

respiratória mitocondrial em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com obesidade mórbida.. In: 35º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2015, Porto Alegre. Anais da 35º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2015.

17.

PARISI, M. M.; COELHO, V. ; SAITOVITCH, D. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBÉ-TUANA, F. M. . Differential cytokine expression, chemokine secretion and phagocytosis in human M1 and M2 macrophages differentiated in vitro. In: XLIII Annual Meeting of SBBQ, 2014, Foz do Iguaçu. Annals of XLIII Annual Meeting of SBBQ, 2014.

18.

ROSA JUNIOR, N. T. ; LAVANDOSKI, P. ; ZATTI, H. ; GRUN, L. K. ; **PARISI, M. M.** ; MATTIELLO, R. ; JONES, M. H. ; GUMA, F. T. C. R. ; BARBÉ-TUANA, F. M. . Comprimento telomérico em crianças prematuras. In: VII Congresso Internacional de Bioanálises, X Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XIV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2014, Novo Hamburgo. Anais do VII Congresso Internacional de Bioanálises, X Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e XIV Semana Gaúcha de Biomedicina, 2014.

19.

GRUN, L. K. ; ZATTI, H. ; **PARISI, M. M.** ; ROSA JUNIOR, N. T. ; LAVANDOSKI, P. ; GUMA, F. T. C. R. ; MATTIELLO, R. ; JONES, M. H. ; BARBÉ-TUANA, F. M. . Avaliação do comprimento relativo de telômeros em uma população de crianças prematuras. In: 34º Semana Científica do HCPA, 2014, Porto Alegre. Anais da 34º Semana Científica do HCPA, 2014.

20.

ZATTI, H. ; BARBÉ-TUANA, F. M. ; GRUN, L. K. ; STEIN, R. ; MATTIELLO, R. ; GUMA, F. T. C. R. ; **PARISI, M. M.** ; JONES, M. H. . Impacto da prematuridade no comprimento dos telômeros em crianças em idade escolar. In: 22º Congresso Brasileiro de Perinatologia, 2014, Brasília. Anais do 22º Congresso Brasileiro de Perinatologia, 2014.

21.

MATTIELLO, R. ; GRUN, L. K. ; **PARISI, MARIANA MIGLIORINI** ; GUMA, FÁTIMA T. C. R. ; BARBÉ-TUANA, FLORENCIA ; MAZZOLA, J. ; STEIN, R. ; JONES, M. H. . Analysis Of Relative Telomere Length In Mild Asthmatic Children. In: American Thoracic Society International Conference, 2014. Am J Respir Crit Care Med, 2014. v. 189.

22.

HIRSCH, G. E. ; **PARISI, M. M.** ; MARTINS, LEO A. M. ; BARBÉ-TUANA, F. M. ; ANDRADE, C. ; GUMA, F. T. C. R. . Gamma-oryzanol Modifies Expression of Caveolin-1 and PCGEM1 Genes in Prostate Cancer Cell Lines Hirsch,. In: XLIII Annual Meeting of SBBQ, 2014, Foz do Iguaçu. Annals of XLIII Annual Meeting of SBBQ, 2014.