

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Curso de Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado

PATRÍCIA LAVANDOSKI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE SENESCÊNCIA E
INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEARES EM
RESPOSTA AO PLASMA DE INDIVÍDUOS
PORTADORES DE OBESIDADE**

PORTO ALEGRE

2016

PATRÍCIA LAVANDOSKI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE SENESCÊNCIA E
INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEARES EM
RESPOSTA AO PLASMA DE INDIVÍDUOS
PORTADORES DE OBESIDADE**

Trabalho de Conclusão do curso de graduação realizado como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Florencia M. Barbé-Tuana, PhD (Orientadora)

Fátima T. Costa Rodrigues Guma (Coorientadora)

PORTO ALEGRE

2016

PATRÍCIA LAVANDOSKI

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE SENESCÊNCIA E INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEARES EM RESPOSTA AO PLASMA DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE

Trabalho de Conclusão do curso de graduação realizado como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 28 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

1. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, PhD. Pos-doutorando - PPG Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina do HCPA - UFRGS.
2. Lucas Kich Grun, MSC.,Doutorando – PPG Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS
3. Florencia M. Barbé-Tuana, PhD (Orientadora, – PPG Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS
4. Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma (Coorientadora) – PPG Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS

PORTO ALEGRE

2016

“There are naive questions, tedious questions, ill-phrased questions, questions put after inadequate self-criticism. But every question is a cry to understand the world. There is no such thing as a dumb question.”

Carl Sagan, *The Demon-Haunted World: Science as a Candle in the Dark.*

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata a todos que me auxiliaram durante o desenvolvimento deste trabalho, tanto através de ensinamentos em laboratório quanto de palavras de incentivo.

Primeiramente agradeço os principais responsáveis por tornar tudo isso possível, meus pais Nadir e Oneida, que mantiveram desde sempre os meus interesses acima dos seus próprios, compartilharam e compartilham dos meus sonhos, estão sempre prontos para me amparar e permitem que eu siga em busca dos meus objetivos. Agradeço também a meu irmão Gabriel que me inspira constantemente a me tornar uma melhor.

Não posso descrever o quão grata sou por tudo que aprendi nestes últimos anos sob orientação da Dra. Florencia Barbé-Tuana, cujas conduta ética e moral, competência e empolgação admiro enormemente. Obrigada por toda a atenção e confiança e por ter lidado com minhas inseguranças com uma calma estoica e bom humor.

Serei eternamente grata a professora Dra. Fátima, coorientadora deste trabalho, que abriu as portas da pesquisa na minha vida quando me aceitou como aluna de iniciação científica e me permitiu vivenciar as experiências mais enriquecedoras da minha formação.

Agradeço a todas as minhas colegas e meus colegas do laboratório 21, com quem passei horas dos últimos anos discutindo sobre “a vida, o universo e tudo o mais” e que tem sido essenciais para meu enriquecimento pessoal e profissional. Obrigada Mari Ilha, Ketlen, Cleverson, Babi e Fran e Leo (cujos corações permanecem no 21). Agradeço em especial o grupo dos telômeros, que me aceitou de braços abertos, à Mari Parisi e Lucas Grun por toda a paciência, tempo e confiança – nunca poderei agradecer o suficiente por tudo o que aprendi com vocês, ao Nevton por toda energia que sempre traz ao

laboratório e ao Vinícius, que entrou recentemente para o grupo e ainda assim me ajudou quando não pude estar presente.

Agradeço a todos meus amigos fora do laboratório, Gisele, Joice, Amanda e Meline por toda troca e paciência ao longo da graduação e da vida e principalmente à Daiana por me ensinar tanto sobre empatia.

Agradeço aos componentes da banca, Eduardo C. Filippi-Chiela e Lucas K. Grun pela disponibilidade e interesse em avaliar este trabalho.

Finalmente, obrigada a UFRGS pela estrutura que permitiu que eu expandisse minha formação para além da sala de aula e à Pró-Pesq e órgãos de pesquisa CAPES, CNPq, FAPERGS pelos recursos que permitiram a execução desse projeto.

RESUMO

O envelhecimento e a senescência celular são caracterizados pela perda de homeostase e aumento da vulnerabilidade do organismo. A obesidade tem sido associada ao envelhecimento precoce, o qual parece estar relacionado ao acúmulo de células senescentes e a um perfil pró-inflamatório, pró-oxidativo e genotóxico. Assim, nosso objetivo foi investigar parâmetros de imunosenescência e de inflamação em células mononucleares de sangue periférico intactas quando expostas ao plasma de indivíduos portadores de obesidade. Para isso, utilizamos células mononucleares de um doador não relacionado incubadas com meio RPMI 1640 contendo 10% de plasma de indivíduos controle (n=9) ou portadores de obesidade (n=9) por 4 ou 24 horas. Avaliamos parâmetros de viabilidade celular (ensaio MTT), morfometria nuclear (NMA), secreção de citocinas, expressão gênica de p21^{CIP1} e imunosenescência de linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) após 24 horas e 120 horas de cultura. Nossos resultados demonstram uma redução na viabilidade das células mononucleares incubadas com o plasma de indivíduos portadores de obesidade após 24 e 120 horas. Entretanto, não observamos diferença em relação à morfometria nuclear, a qual reflete parâmetros de apoptose e senescência. Após 120 horas de incubação posteriores as 4h de exposição ao plasma de pacientes obesos, observamos um perfil secretor pró-inflamatório (IL-1 β , IL-8 e TNF- α) aumentado. Após 24h de exposição ao plasma, além do aumento de IL-6, IL-1 β e IL-8, observamos maior expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Essa transformação foi acompanhada pela modulação dos linfócitos T, CD4+ e CD8+ para o perfil imunosenescente. Nossos resultados salientam o potencial de imunomodulação de células mononucleares pelo plasma de pacientes com obesidade para um fenótipo senescente e pró-inflamatório.

Palavras-chave: Análise morfométrica nuclear (NMA), células mononucleares, inflamação, obesidade, senescência celular.

LISTA DE ABREVIATURAS

(IFN)- γ	Interferon-gama
AD	Alzheimer
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CDKN1A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1 A
CDKN2A/B	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2 A/B
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CVD	Doença cardiovascular
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DDR	Resposta ao dano no DNA
Dis	Dislipidemia
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EH	Esteatose Hepática
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
GNB2L1	<i>Guanine nucleotide-binding protein, beta-peptide 2-like 1</i>
I	Núcleo irregular
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corporal
LI	Núcleo grande e irregular
LR	Núcleo grande e regular
MFI	Mediana da intensidade de fluorescência.
M-MuLV	Enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de moloney
MTT	<i>3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
N	Núcleo normal

NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NII	Índice de irregularidade nuclear
NMA	Análise morfométrica nuclear
p15 ^{INK4B}	Proteína 15 (CDKN2B)
p16 ^{INK4A}	Proteína supressora tumoral 16 (CDKN2A)
p21 ^{CIP1}	Proteína 21 (CDKN1A)
p53	Proteína tumoral 53
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa
S	Núcleo pequeno
SA- β -gal	Beta-galactosidase associada à senescência
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência
SH	Hipertensão sistêmica
SI	Núcleo pequeno e irregular
SM	Síndrome Metabólica
SNPs	Polimorfismos de base única
SR	Núcleo pequeno e regular
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Linfócito T auxiliar 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos específicos usados.....	30
Tabela 2. Dados demográficos da amostra.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando os efeitos sistêmicos do acúmulo de tecido adiposo e a relação entre obesidade, inflamação e imunosenescência	20
Figura 2. Esquema ilustrando a metodologia utilizada em linha cronológica.....	27
Figura 3. Viabilidade celular diminuída em PBMC incubadas por 24 horas e 120 horas após 4h de exposição ao plasma de pacientes controles (n = 9) ou portadores de obesidade (n = 9)	34
Figura 4. Análise morfométrica nuclear (NMA).....	36
Figura 5. Análise morfométrica nuclear (NMA).....	37
Figura 6. Análises de área de núcleos por NMA.....	39
Figura 7. Redução da expressão de CD28, marcador de superfície negativamente correlacionado com o perfil de imunosenescência	41
Figura 8. Alterações na expressão de citocinas em PBMCs incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade.....	43
Figura 9. Expressão gênica diminuída de p21CIP1 em PBMCs incubadas com plasma de indivíduos obesos por 120 horas.	44
Figura 10. Esquema ilustrando os principais resultados encontrados no presente estudo.	45

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Envelhecimento e senescência celular</i>	15
1.2	<i>Obesidade como modelo de inflamação e envelhecimento precoce</i>	17
1.3	<i>Fenótipo secretor associado à senescência: SASP</i>	18
1.4	<i>Avaliação de imunosenescência por expressão de CD28⁺</i>	20
1.5	<i>p21^{CIP1}</i>	21
1.6	<i>Análise Morfométrica Nuclear (NMA)</i>	21
1.7	<i>Fenótipo secretor associado à senescência (SASP)</i>	22
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVOS	24
3.1	<i>Objetivos gerais</i>	24
	Investigar o efeito do plasma de indivíduos portadores de obesidade na modulação de células mononucleares intactas do sangue periférico averiguando parâmetros de inflamação e imunosenescência.....	24
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	<i>Participantes do estudo</i>	25
4.1.1	<i>Critérios de inclusão</i>	25
4.1.2	<i>Critérios de exclusão</i>	25
4.2	<i>Amostra biológica</i>	26
4.2.1	<i>Purificação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)</i>	26
4.3	<i>Cultura celular</i>	26
4.4	<i>Ensaio de viabilidade celular (MTT)</i>	27
4.5	<i>Imunofenotipagem</i>	28
4.6	<i>Extração de RNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para p21^{CIP1}</i>	28
4.7	<i>Análise morfológica nuclear (NMA)</i>	30
4.8	<i>Quantificação de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA)</i>	31

4.9	<i>Análise estatística</i>	32
5.	RESULTADOS	33
5.1	<i>Dados demográficos</i>	33
5.2	<i>Redução da viabilidade de PBMC tratadas com plasma de indivíduos com obesidade.</i> 33	
5.3	<i>Análise morfológica nuclear como parâmetro de senescência celular.</i>	34
5.5	<i>O plasma de indivíduos com obesidade aumenta a expressão de citocinas pró- inflamatórias observadas no fenótipo SASP</i>	41
5.6	<i>A cultura de PBMC com plasma de indivíduos com obesidade diminui a expressão do marcador p21^{CIP1}</i>	44
6.	DISCUSSÃO	46
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	PERSPECTIVAS	54
9.	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO I - PARECER APROVADO DO CEP DA UFRGS	61
	ANEXO II – PARECER APROVADO DO CEP DA PUC/RS	63
	ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Envelhecimento e senescência celular*

O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva de homeostase e acarreta no comprometimento de funções essenciais à sobrevivência, aumentando a vulnerabilidade do organismo. O acúmulo de danos celulares em níveis diversos é hoje considerado a principal causa de envelhecimento e decorre de um processo multifatorial sobre o qual atuam tanto fatores externos, ambientais e sociais assim como fatores internos, genéticos e biológicos [1].

Algumas doenças crônicas como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardiovascular (CVD), Alzheimer (AD) e alguns tipos de câncer [2, 3, 4] têm sido associadas com o envelhecimento precoce do indivíduo. Trabalhos recentes têm apontado uma correlação negativa entre obesidade e o comprimento telomérico (um biomarcador de envelhecimento) em células brancas do sangue [5, 6], um forte indício de envelhecimento celular precoce nesses pacientes.

A nível celular, a senescência pode ser definida como uma parada permanente de ciclo celular em células proliferativas, acompanhada por alterações no secretoma e na morfologia da célula. Embora nos indivíduos adultos seja majoritariamente associada com a parada da capacidade replicativa, a senescência celular é um mecanismo de grande importância para manutenção da homeostase tecidual tanto na fase embrionária, onde existe um mecanismo ativo de remodelação tecidual [7], quanto na fase adulta, onde atua como um mecanismo ativo anti-tumoral promovendo a remoção de células com alta taxa de dano ao DNA ou potencialmente oncogênicas. Porém, a eficiência desse mecanismo de remoção depende da função das células do sistema

imune inato, principalmente monócitos e macrófagos, os quais eliminam as células senescentes afim de não comprometer a função tecidual [1].

Com o envelhecimento fisiológico, no entanto, há diminuição na capacidade do organismo em promover uma resposta imune efetiva devido à perda de função das células do sistema imune, as quais também podem se tornar senescentes - ou imunosenescentes [8]. Entretanto, em condições patológicas como a obesidade, onde se observa um perfil de inflamação sistêmica crônica de baixo grau resultante de um desbalanço entre vias pró e anti-inflamatórias [9] e estresse oxidativo, a senescência pode ser induzida de forma precoce e mais abruptamente. Esse fenótipo tem sido denominado *inflammaging* [10, 11].

A inflamação associada ao envelhecimento é multifatorial, mas pode ser relacionada ao acúmulo de dano tecidual, à ineficiência do sistema imune na remoção de patógenos e de células disfuncionais, resposta inflamatória descontrolada, ao secretoma com perfil pró-inflamatório das células senescentes, entre outros fatores [1]. Enquanto o desbalanço pró-inflamatório sistêmico leva as células do sistema imune a entrar no estado senescente, estas células passam a produzir ainda mais citocinas pró-inflamatórias, acarretando em um sistema que se retroalimenta positivamente.

A imunosenescência se caracteriza por deficiência na produção (hematopoiese), maturação e função de células B e T na medula óssea e timo por acúmulo excessivo de dano [12], além da atrofia do timo observada com o avanço da idade [13].

Esse perfil se reflete a nível sistêmico e pode ter impacto exponencial sobre o envelhecimento, uma vez que as células do sistema imune são de extrema importância na remoção de células disfuncionais dos tecidos [1]. Assim, a perda de eficiência por células do sistema imune na eliminação de células senescentes em diversos tecidos

compromete o organismo de forma global e diferencial e amplifica o estado senescente em diversos órgãos.

1.2 Obesidade como modelo de inflamação e envelhecimento precoce

A obesidade é uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal cuja prevalência tem aumentado significativamente nos últimos anos segundo dados da Organização Mundial da Saúde [53]. A expansão exacerbada do tecido adiposo pode levar ao aumento do número de células apoptóticas e, conseqüentemente, ao recrutamento de macrófagos, induzindo um perfil pró-inflamatório. Evidências recentes têm associado o desbalanço inflamatório e oxidativo observado em indivíduos portadores de obesidade com o desenvolvimento de doenças tipicamente relacionadas ao envelhecimento como DM2, doenças cardiovasculares [4] e inclusive alguns tipos de cânceres.

Outras evidências mais diretas também sugerem a associação entre obesidade e envelhecimento celular prematuro, como o encurtamento telomérico em células brancas do sangue de mulheres portadoras de obesidade [14]. Telômeros são um biomarcador de envelhecimento celular localizados na extremidade dos cromossomos que tem como função proteger o DNA e que sofrem um encurtamento a cada divisão celular. Vários trabalhos, inclusive dados gerados pelo nosso grupo (manuscrito em reparação) demonstram uma associação entre encurtamento telomérico acelerado e obesidade. Assim, o predomínio de telômeros encurtados em indivíduos portadores de obesidade corrobora com a ideia de um envelhecimento celular precoce nesses indivíduos, uma vez que o encurtamento acelerado de telômeros diante do stress crônico pode acarretar no acúmulo de células disfuncionais observado no envelhecimento.

O tecido adiposo tem sido reconhecido como um importante órgão endócrino, secretando uma série de adipocinas (hormônios, citocinas inflamatórias, quimiocinas e hormônios de crescimento, entre outros), as quais estão envolvidas em diversas vias [15] e cujos efeitos se refletem a nível sistêmico [11]. Em indivíduos portadores de obesidade, a expansão excessiva do tecido adiposo, consequência tanto do aumento de tamanho dos adipócitos (hipertrofia) como da sua multiplicação (hiperplasia), pode acarretar em um desequilíbrio no perfil de secreção dessas adipocinas, além do recrutamento de células sistema imune relacionadas à resposta inflamatória Th1 (T auxiliar 1), macrófagos com secreção de citocinas com perfil anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), células T CD8+ e células T secretoras de interferon (IFN)- γ , as quais participam na regulação da homeostasia do tecido visceral [16].

O recrutamento de células do sistema imune se dá principalmente devido ao surgimento de células apoptóticas no tecido adiposo em decorrência da hipertrofia dessas células. Os adipócitos apoptóticos são cercados por macrófagos formando estruturas conhecidas como “*crown-like*” (semelhante a coroa), marcador de inflamação no tecido adiposo. Essa associação leva à produção de uma série de fatores pró-inflamatórios - tanto por parte dos adipócitos quanto pelas células do sistema imune - que podem atuar tanto de forma parácrina quanto endócrina sobre outros tecidos, aumentando o risco de desenvolvimento de uma série de doenças como resistência insulínica, hiperglicemia, hiperlipidemia e lesão vascular [17].

1.3 Fenótipo secretor associado à senescência: SASP

As células senescentes exercem grande influência sobre as células em seu entorno e podem induzir nestas um perfil semelhante ao próprio. A indução de senescência em células vizinhas se dá em grande parte pelo desbalanço na secreção de

citocinas pró-inflamatórias, as quais passam a acumular no microambiente tecidual acarretando em um perfil de “envelhecimento contagioso” (“*contagious aging*”) [1].

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição pleiotrópico que governa a sinalização de vários processos celulares comprometidos majoritariamente com as vias de ativação de citocinas pró-inflamatórias. Têm-se hipotetizado que sua ativação crônica está intimamente relacionada com incidência diabetes mellitus tipo 2 (DM2), artrite reumatoide e câncer [18]. Uma consequência direta da ativação do NF- κ B no contexto genotóxico, pró- inflamatório e pró-oxidativo é a indução de senescência celular e do fenótipo secretor associado a senescência (SASP) [19] que contribui para a inflamação sistêmica.

A constante secreção de fatores pró-inflamatórios pelo tecido adiposo em indivíduos portadores de obesidade acarreta em um perfil de inflamação sistêmica de baixo grau, o qual compromete as vias de sinalização da resposta ao dano no DNA (DDR) [20], acelera o encurtamento telomérico [5], aumenta o estresse oxidativo sistêmico [21] e modula as células para um SASP, as quais passam a retroalimentar o quadro de inflamação sistêmica [22]. Esses efeitos, decorrentes da para-inflamação em sujeitos com obesidade, aumentam o risco para o aparecimento precoce de doenças associadas com o envelhecimento.

Polimorfismos de base única (SNPs) em genes chaves no controle do ciclo celular, como o da proteína supressora de tumor p53, das inibidoras de cinases do ciclo celular (oriundas dos locus CDKN2A/B que codificam para os transcritos alternativos p16^{INK4A} e p15^{INK4B}) também têm sido associados diferencialmente com doenças crônicas associadas com o envelhecimento e obesidade [23]. Esses resultados sugerem uma

expressão CD28+ em uma população celular tem sido utilizado como marcador de senescência em linfócitos T [31].

1.5 $p21^{CIP1}$

A proteína $p21^{CIP1}$ é um inibidor da cinase dependente de ciclina codificada pelo gene CDKN1A e tem sido referida como um importante iniciador da senescência celular, embora a extensão de seu papel nesse desfecho ainda permanece bastante controverso. Sabe-se que $p21^{CIP1}$ é importante na indução da senescência, uma vez que leva à parada de ciclo em G1 após dano ao DNA de forma dependente de p53. Porém, tem sido demonstrado que sua expressão declina após o estabelecimento da senescência, indicando que a proteína $p21^{CIP1}$ talvez não desempenhe um papel na manutenção do *status* senescente. Embora possa não ser considerada um bom marcador para células no estado de senescência, pode indicar a indução da parada de ciclo celular em resposta a dano ao DNA, permitindo o reparo do DNA e facilitando a sobrevivência celular [45].

1.6 *Análise Morfométrica Nuclear (NMA)*

Alterações na morfologia nuclear são observadas durante uma série de estados fisiológicos como mitose, senescência, respostas à estresse, etc., o que permite que uma série de processos sejam inferidos a partir da avaliação da morfologia nuclear. A fim de padronizar essa análise, após a marcação do núcleo, utilizamos uma técnica de análise morfométrica nuclear que combina quatro parâmetros ("*aspect*", "*area box*", "*radius ratio*" e "*roundness*") de irregularidade para gerar um índice de irregularidade nuclear (NII) o qual, associado à área nuclear, permite inferir o *status* celular. Assim, a análise morfométrica nuclear (NMA) permite indicar qual proporção das células na cultura

encontram-se em senescência, apoptose ou apresentam irregularidades nucleares com base apenas na morfologia nuclear [26].

1.7 *Fenótipo secretor associado à senescência (SASP)*

Células senescentes são caracterizadas pela parada do ciclo celular e apresentam um fenótipo secretor (secretoma) próprio, o qual envolve um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 (α e β), IL-6 e IL-8. A fim de identificar se houve indução desse perfil secretor pró-inflamatório nas células saudáveis expostas ao plasma de portadores de obesidade, visamos realizar a detecção dessas citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante das células mononucleares mantidas em cultura. Para isso utilizamos um kit para delineamento do perfil inflamatório, o qual abrange as citocinas pró-inflamatórias observadas no SASP (IL-1 β , IL-6 e IL-8) além de TNF- α e IL-12 e da citocina regulatória IL-10 (normalmente associada à atenuação da resposta pró-inflamatória) [22].

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a obesidade é caracterizada por um perfil pró-inflamatório crônico e sistêmico cujas consequências se refletem no envelhecimento precoce das células do

sistema imune através do encurtamento telomérico. Assim, a modulação de células saudáveis pelo plasma de indivíduos portadores de obesidade pode representar um modelo para esclarecer a relação entre o ambiente pró-inflamatório e a entrada das células do sistema imune e demais tipos celulares no estado de senescência.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivos gerais*

Investigar o efeito do plasma de indivíduos portadores de obesidade na modulação de células mononucleares intactas do sangue periférico averiguando parâmetros de inflamação e imunosenescência.

3.2 *Objetivos específicos*

1. Avaliar parâmetros associados com viabilidade celular por MTT;
2. Avaliar parâmetros de senescência celular por análise morfométrica nuclear (NMA);
3. Avaliar parâmetros de imunosenescência celular pela expressão de CD28 por *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS);
4. Avaliar a expressão gênica relativa de p21^{CIP1} pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR);
5. Quantificar a secreção de citocinas associadas ao fenótipo de senescência (IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF) e da citocina regulatória IL-10 por FACS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Participantes do estudo*

Esse trabalho faz parte de um projeto maior em andamento denominado “*Avaliação do comprimento dos telômeros em pacientes obesos com indicação de tratamento cirúrgico e sua evolução após a cirurgia bariátrica*” previamente aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFRGS (Anexo I) e da PUCRS (Anexo II).

4.1.1 *Critérios de inclusão*

A identificação, a seleção e o recrutamento dos participantes foi realizada pela equipe dos Profs. Cláudio C. Mottin e Alexandre V. Padoin do Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas (PUC-RS) entre outubro de 2014 e janeiro de 2015. O grupo controle foi constituído por 9 indivíduos saudáveis, que realizavam exames de rotina. Todos os participantes (controles e casos) leram e concordaram em participar desse estudo por vontade própria e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III) previamente às coletas.

Para esse estudo utilizamos 9 pacientes com obesidade (índice de massa corporal (IMC) $\geq 35 \text{ kg/m}^2$) e 9 controles eutróficos ($18,5 \text{ kg/m}^2 < \text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$) com idade entre 18 e 65 anos. A classificação com base no IMC seguiu os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2011 [53].

4.1.2 *Critérios de exclusão*

Excluimos do grupo controle indivíduos portadores de doenças crônicas (DM2, síndrome metabólica, CVD, doenças inflamatórias e respiratórias) bem como consumidores de álcool, tabaco e medicação controlada (antidepressivos ou ansiolíticos) ou com menos de 18 e mais de 65 anos.

4.2 *Amostra biológica*

Nesse estudo utilizamos plasma (proveniente de sangue periférico) previamente estocado a -80°C . As amostras de sangue periférico (10 mL em tubo contendo EDTA como anticoagulante) foram coletadas por venipuntura no Hospital São Lucas da PUCRS e processadas no laboratório de Biologia Celular de Lipídios (coordenação da Profa. Fátima T.C.R. Guma). O sangue coletado foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para separação do plasma e posterior armazenamento a -80°C .

4.2.1 *Purificação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)*

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) utilizadas na cultura foram isoladas a partir de indivíduo eutrófico não relacionado. As PBMC foram isoladas por gradiente de Ficoll (Histopaque 1,077 g/mL, Sigma Aldrich, Missouri, USA) através da centrifugação do sangue total a 400 rcf por 30 minutos com desaceleração zero. A camada de mononucleares foi então coletada com pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo, onde as células foram lavadas por duas vezes com PBS (centrifugação 1500 rpm, 5 minutos) e por fim contadas em Câmara de Neubauer.

4.3 *Cultura celular*

Após o isolamento, as PBMCs (5×10^6 células/mL) foram semeadas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Califórnia, USA) (pH = 7,4) suplementado com 2g/dL de HEPES, 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 2mM de glutamina (Invitrogen) e 10% de plasma de indivíduos controle (n = 9) ou portadores de obesidade (n = 9) e incubadas por 4 ou 24 horas em câmara úmida a 37°C e 5% CO_2 . Após o período de 4 horas de tratamento, o meio foi removido e substituído por RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino

(FBS) e as células foram incubadas por mais 24 ou 120 horas em câmara úmida a 37°C e 5% CO₂.

Após 24 ou 120 horas em cultura, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior detecção de citocinas. Parte das PBMC tratadas foi armazenada em TRIzol (Invitrogen,) a -80°C para posterior extração de RNA e utilizadas nos demais experimentos. No terceiro dia de cultura (72 horas) 50% (v/v) do meio de cultura RPMI 1640 + 10% FBS foi substituído.

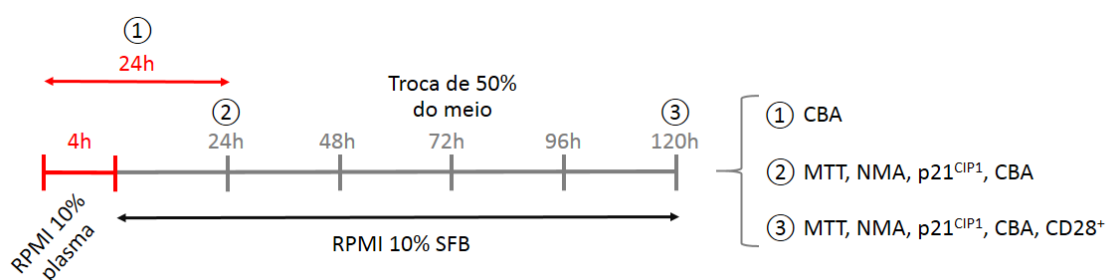


Figura 2. Esquema ilustrando a metodologia utilizada em linha cronológica. 5×10^6 células/mL foram semeadas e tratadas por 4 horas com plasma de indivíduos controle ($n = 9$) ou com obesidade ($n = 9$). Após esse período o meio foi trocado e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). No tempo indicado, 1, 2, ou 3, foram realizados os diferentes ensaios. CBA: Secreção de citocinas por *Cytometric Bead Array*; MTT: ensaio de viabilidade; expressão gênica de p21^{CIP1} e imunofenotipagem para expressão de CD28.

4.4 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Utilizamos o ensaio de viabilidade celular MTT, o qual se baseia na redução do composto MTT (*3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*) pelas enzimas oxidorreduções dependentes de NAD(P)H presentes em células viáveis e com metabolismo ativo gerando um produto solúvel, o formazan, de coloração púrpura. Este experimento foi realizado em placa de 96 poços. As PBMCs foram semeadas na concentração de $62,5 \times 10^4$ células em 50 μ L. A análise foi realizada 24 ou 120 horas

após o tratamento. Para a marcação o meio foi retirado dos poços e adicionados 40µL de MTT (5mg/mL, Sigma Aldrich). Após 2 horas de incubação a 37°C em câmara úmida com 5% CO₂, o meio foi aspirado e substituído por 120 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). O formazan intracelular foi detectado através da leitura de absorbância em espectrofotômetro de placa (SpectraMax® M5, Molecular Devices) em comprimento de onda 570 e 630 nm.

4.5 *Imunofenotipagem*

A avaliação de imunosenescência pelo marcador CD28 foi realizada por FACS. As PBMC cultivadas em placas de 24 poços foram tratadas por 4 horas em meio RPMI contendo 10% plasma de indivíduos controles e portadores de obesidade e adquiridas após 120 horas de cultura. As PBMC (0,5 x 10⁶) previamente tratadas foram marcadas com os anticorpos anti-CD4-PE (1:100) ou anti-CD8-FITC (1:100) e anti-CD28-APC (1:100) em *Staining Buffer* (BD Biosciences, California, USA) e incubados por 30 minutos a 4°C no escuro. As células foram então lavadas com tampão de marcação (FBS 0,5% em PBS) e adquiridas (20.000 eventos) e analisadas no BD Accuri™ C6 (BD Biosciences).

4.6 *Extração de RNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para p21^{CIP1}*

As células (0,5 x 10⁶) previamente tratadas e incubadas por 24h e 120 horas foram armazenadas em 750µL de TRIzol (Invitrogen) a -80°C previamente à extração de RNA. Após descongelamento, foram adicionados 200µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas por 15 minutos a

temperatura ambiente. Após nova centrifugação (12.000 rcf 15 minutos a 4°C) a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e o material genético foi precipitado com 500µL de álcool isopropílico e misturado por inversão cuidadosamente. As amostras foram novamente incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas a 1.200 rcf por 15 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol 70% em água livre de RNAses (previamente tratada com 0,1% diethylpyrocarbonate (DEPC)) e realizada nova centrifugação a 7500 rcf por 5 minutos ainda a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA obtido foi ressuscitado em 12µL de H₂O 0,1% DEPC e então quantificado no espectrofotômetro. O RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (M-MuLV) (Sigma-Aldrich) e oligonucleotídeos randômicos (Sigma-Aldrich) a partir de 1,673 µg de RNA. Para avaliação da expressão gênica foi realizada a amplificação do gene-alvo p21^{CIP1} (CDKN1A) ou controle endógeno GNB2L1 a partir de 5µL de cDNA (diluição 1:20) com a enzima *Taq Platinum® Polymerase* (Invitrogen) em volume final de 20µL contendo os reagentes e oligonucleotídeos específicos. As sequências de oligonucleotídeos específicos foram desenhadas pelo programa da IDT (www.idtdna.com) a partir de banco de base de dados disponível na internet (Ensembl ou NCBI) e estão especificadas na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos específicos usados.

Nome do gene	Locus	Sequência de oligonucleotídeos (direto e reverso)	Tamanho do produto (pb)
GNb2L1*	NM_006098	GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC	224
CDKN1A (p21 ^{CIP1})	NM_001291549.1 NM_001220778.1 NM_001220777.1 NM_078467.2 NM_000389.4	ACTCTCAGGGTCGAAAACGG ATGTAGAGCGGGCCTTTGAG	149

Abreviaturas: GNB2L1: Guanine nucleotide-binding protein, beta-peptide 2-like 1, CDKN1A: cyclin dependent kinase inhibitor 1A.

*[54].

A especificidade das reações e ausência de dímeros de primer foi avaliada através da curva de dissociação gerada ao final de cada corrida. Confirmamos também a especificidade do produto alvo (amplicon) através de corrida em gel de agarose. Todas as reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus® (Applied Biosystems). A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método comparativo (Delta delta Ct, $\Delta\Delta Ct$) (Ct, *cycle threshold*) [24] utilizando como normalizador o gene constitutivo GNb2L1, calibrado pela média do CT do grupo analisado.

4.7 Análise morfométrica 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 (*small and regular* – SR), pequeno (*small* - S), pequeno e irregular (*small and irregular* – SI), grande e regular (*large and regular* – LR) e grande e irregular (*large and irregular* – LI) gerando um valor de índice de irregularidade nuclear (NII) [25].

Para esse ensaio, as PBMC (tratadas com plasma de indivíduos controles n = 9 ou tratadas com plasma de indivíduos com obesidade n = 9) foram semeadas sobre lamínulas e tratadas por 4 horas como especificado previamente. Após 24 e 120 horas as PBMC foram lavadas com PBS de forma que apenas as células aderidas (monócitos/macrófagos) pudessem ser avaliadas. As PBMC foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v em PBS) lavadas com tampão Tris-glicina 1X (0,025M Tris base e 0,192M Glicina) e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas com Hoescht 33342 10ug/mL (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) por 10 minutos para marcação dos núcleos. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS ainda nos poços, as lamínulas foram retiradas com auxílio de pinça e colocadas sobre uma lâmina contendo 10µL de Fluoromount (Sigma-Aldrich), onde ficaram secando por 24h antes de observação no microscópio.

Cinquenta núcleos de cada cultura (n = 16) foram fotografados via 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 *Image-Pro Plus*. 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 no site do LabSinal [26].

4.8 Quantificação de citocinas por Cytometric Bead Array (CBA)

As citocinas secretadas no meio de cultura foram quantificadas após 24 horas de incubação com plasma e após 4 horas e 120 horas em cultivo posteriores a 4 horas de incubação com plasma e avaliadas por citometria de fluxo 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 FACP Array v3.0.1 (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). Os limites de detecção dos analitos foram 3,6 pg/mL para IL-8; 7,2 pg/mL para IL-1 β ; 2,5 pg/mL para IL-6; 3,3 pg/mL para IL-10; 3,7 pg/mL para TNF- α e 1,9 pg/mL para IL-12.

4.9 *Análise estatística*

Utilizamos o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar normalidade na distribuição das amostras para cada variável mensurada. Para a comparação entre os dois grupos utilizamos teste t de *Student* para dados com distribuição normal ou teste Mann-Whitney para dados que não seguiram a distribuição normal. Para a comparação entre três ou mais grupos, utilizamos análise de variância (ANOVA) para os dados que seguiram a distribuição normal ou Kruskal-Wallis quando a distribuição de ao menos um dos grupos em comparação não foi normal. As análises de correlação foram realizadas através do teste de correlação paramétrico de Pearson. Todas as análises foram realizadas com o programa Graphpad Prism versão 5.0 e as figuras montadas com o programa Corel DRAW *Home and Student X6* (2012).

5. RESULTADOS

5.1 *Dados demográficos.*

Os indivíduos participantes do estudo estão descritos na Tabela 2. Não houve diferença quanto a gênero e idade. Como esperado, o IMC, que foi o principal critério para separar o grupo controle do grupo caso, se mostrou estatisticamente diferente entre os dois grupos ($P < 0,0001$).

Tabela 2. Dados demográficos da amostra

	Grupo de indivíduos controle, (n=9)	Grupo de indivíduos com obesidade, (n=9)	Valor P
Gênero, masculino (%)	4 (44,4)	3 (33,3)	n.s.
Idade, média (DP)	29,8 (4,34)	35,8 (3,83)	n.s.
IMC (kg/m ²), média (DP)	21,3 (1,2)	50,3 (7,8)	< 0,0001[†]
Comorbidades (%)			
DM2	-	4 (44,4)	
Dis.	-	7 (77,7)	
EH	-	3 (33,3)	
HS	-	6 (66,6)	
SM	-	7 (77,7)	

Abreviaturas: DM2: diabetes mellitus tipo 2; Dis: dislipidemia, DR: desvio padrão; EH: esteatose hepática; HS: hipertensão sistêmica; SM: síndrome metabólica; n.s.: não significativo. [†]: Teste Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5.2 *Redução da viabilidade de PBMC tratadas com plasma de indivíduos com obesidade.*

Para determinar se o plasma de indivíduos com obesidade é capaz de afetar a viabilidade PBMC intactas, realizamos um ensaio de viabilidade pela quantificação da formação de sais de formazan (ensaio MTT). Nesse sentido, quando comparamos as células viáveis tratadas com plasma de indivíduos controle ou de indivíduos com

obesidade, observamos uma diminuição na viabilidade celular de PBMC cultivadas tanto após 24 horas ($P = 0,0116$) como após 120 horas ($P = 0,0007$) com o plasma dos indivíduos com obesidade (**Fig. 3**). Esse resultado indica uma diminuição no metabolismo celular total das células expostas ao plasma de portadores de obesidade em relação as células expostas ao plasma de indivíduos controles e pode ser um indício indireto de maior morte celular.

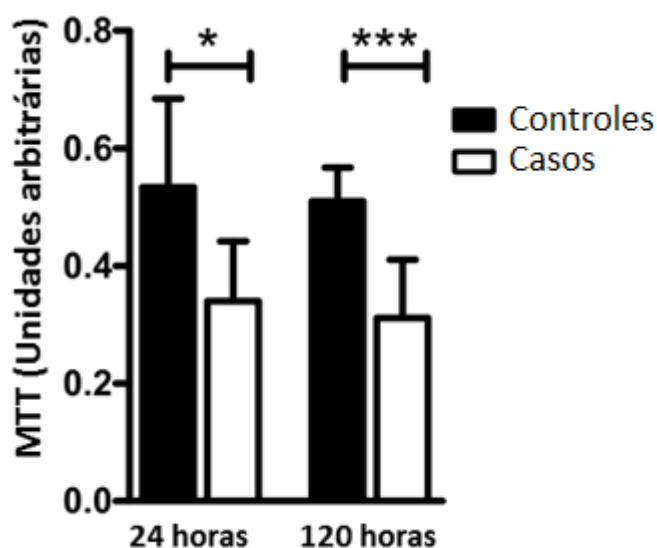


Figura 3. Viabilidade celular diminuída em PBMC incubadas por 24 horas e 120 horas após 4h de exposição ao plasma de pacientes controles ($n = 9$) ou portadores de obesidade ($n = 9$). Os dados representam média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas com teste de t de Student e diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$ (* $P = 0,0116$ e *** $P = 0,0007$).

5.3 Análise morfométrica nuclear como parâmetro de senescência celular.

Na análise da morfometria nuclear avaliamos os núcleos de 50 células afim de compreender sua distribuição nos grupos definidos como: normal (N), irregular (I), apoptose (SR, S ou SI) ou senescência (LR e LI) geradas a partir do NII. Nas culturas analisadas (32 no total) não houve diferença estatística entre casos e controles em

nenhum dos dois tempos, 24 horas (8 controles versus 8 casos, total 16 culturas) (**Fig. 4A**) ou 120 horas (8 controles versus 8 casos, total 16 culturas) ($P > 0,05$) (**Fig. 4B**). Os valores estão representados em forma de gráfico na **Figura 5**.

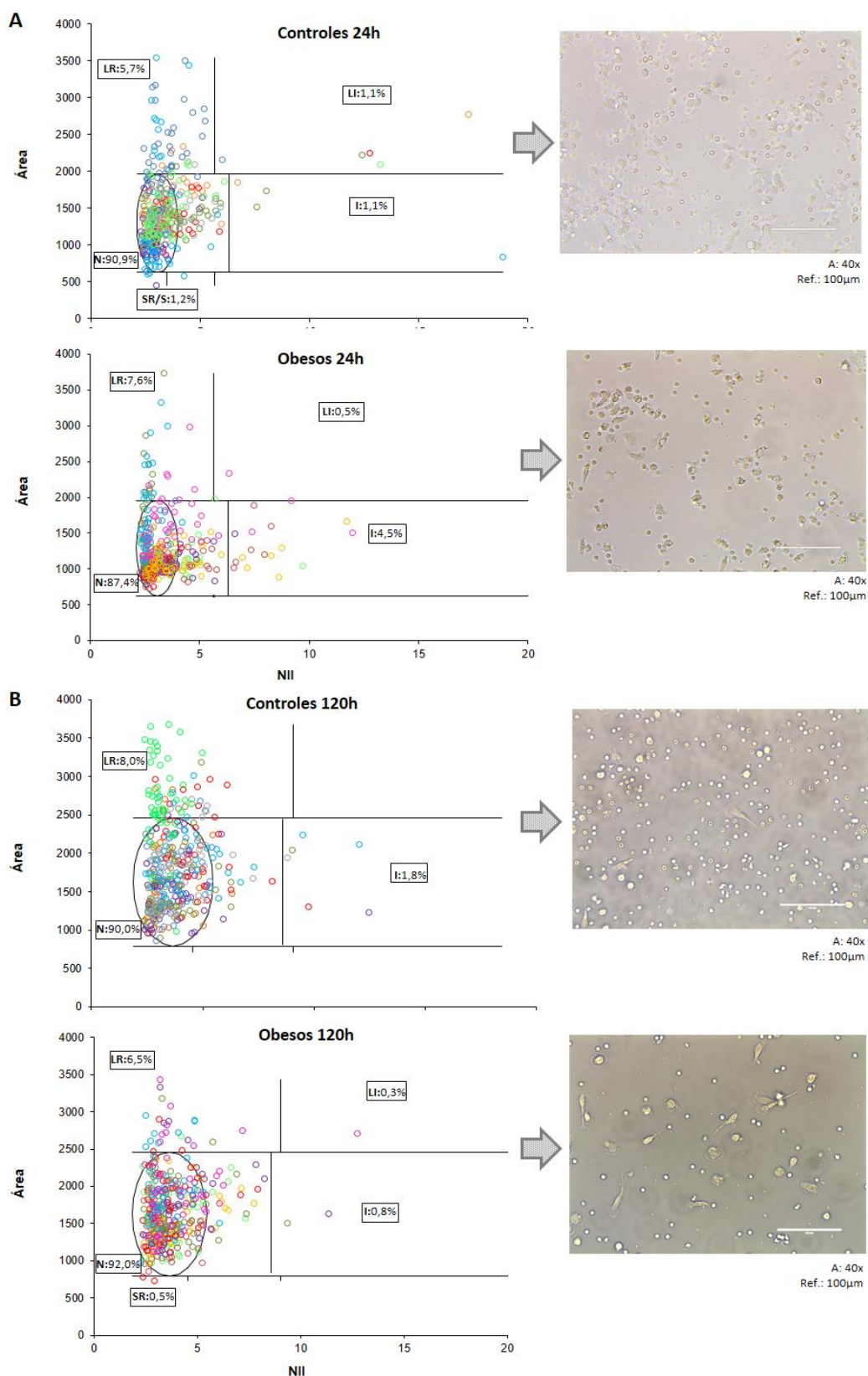


Figura 4. Análise morfométrica nuclear (NMA). Distribuição dos 50 núcleos analisados das PBMC tratadas com plasma do grupo controle ($n = 8$, acima) e plasma de indivíduos com obesidade ($n = 8$, abaixo) por 4 horas e analisadas após A) ou B) 120 horas de cultura. Nos

diferentes quadrantes está indicada a porcentagem de núcleos em cada condição. A direita de cada gráfico está uma imagem de microscopia representativa de cada cultura celular após 24 e 120 horas de cultura.

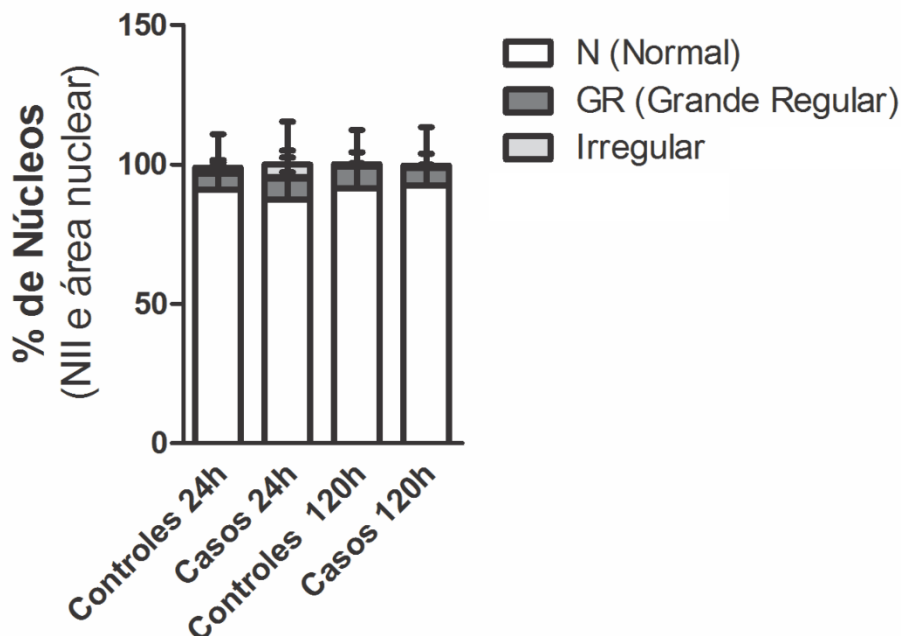


Figura 5. Análise morfométrica nuclear (NMA). Representação gráfica da distribuição de núcleos por categoria pré-definida com base no NII (índice de irregularidade nuclear) e área nuclear nos diferentes grupos e tempos. Os dados representam média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas com o teste Kruskal-Wallis e diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Também plotamos os núcleos exclusivamente em relação à sua área dentro de cada grupo, controle ou caso, após 24 ou 120 horas de tratamento. Observamos que a distribuição dos 50 núcleos por área, quando evidenciada para cada indivíduo, foi homogênea dentro grupo controle em 24 horas (**Fig. 6A**, esquerda). Entretanto, dentro do grupo de casos observamos grande heterogeneidade e foi possível evidenciar dois subgrupos. Três indivíduos apresentam núcleos com maior área (máx. 3.730mm², MED>1200) e os outros 5 indivíduos tem valores de área menores (máx. 1.974mm²,

mediana <1.100) (**Fig. 6A**, direita). A mesma análise foi feita no tempo de 120 horas. Visivelmente, nesse tempo as análises de morfometria nuclear demonstraram homogeneidade quanto a comparação intra e inter-grupo (**Fig. 6B**). Essa mudança no perfil das culturas é corroborada pela redistribuição dos núcleos em relação à área e NII após 120 horas em cultivo em relação à 24 horas, e em relação à área nos mesmos tempos, onde é observada diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) (**Fig. 6C**).

Não encontramos correlações entre área e os dados demográficos dos indivíduos analisados: IMC ou idade (**Fig. 6D**). O reduzido tamanho da nossa amostra não permitiu realizar correlações entre área e as comorbidades relatadas na Tabela 2 (DM2, dislipidemias, EH, HS ou SM).

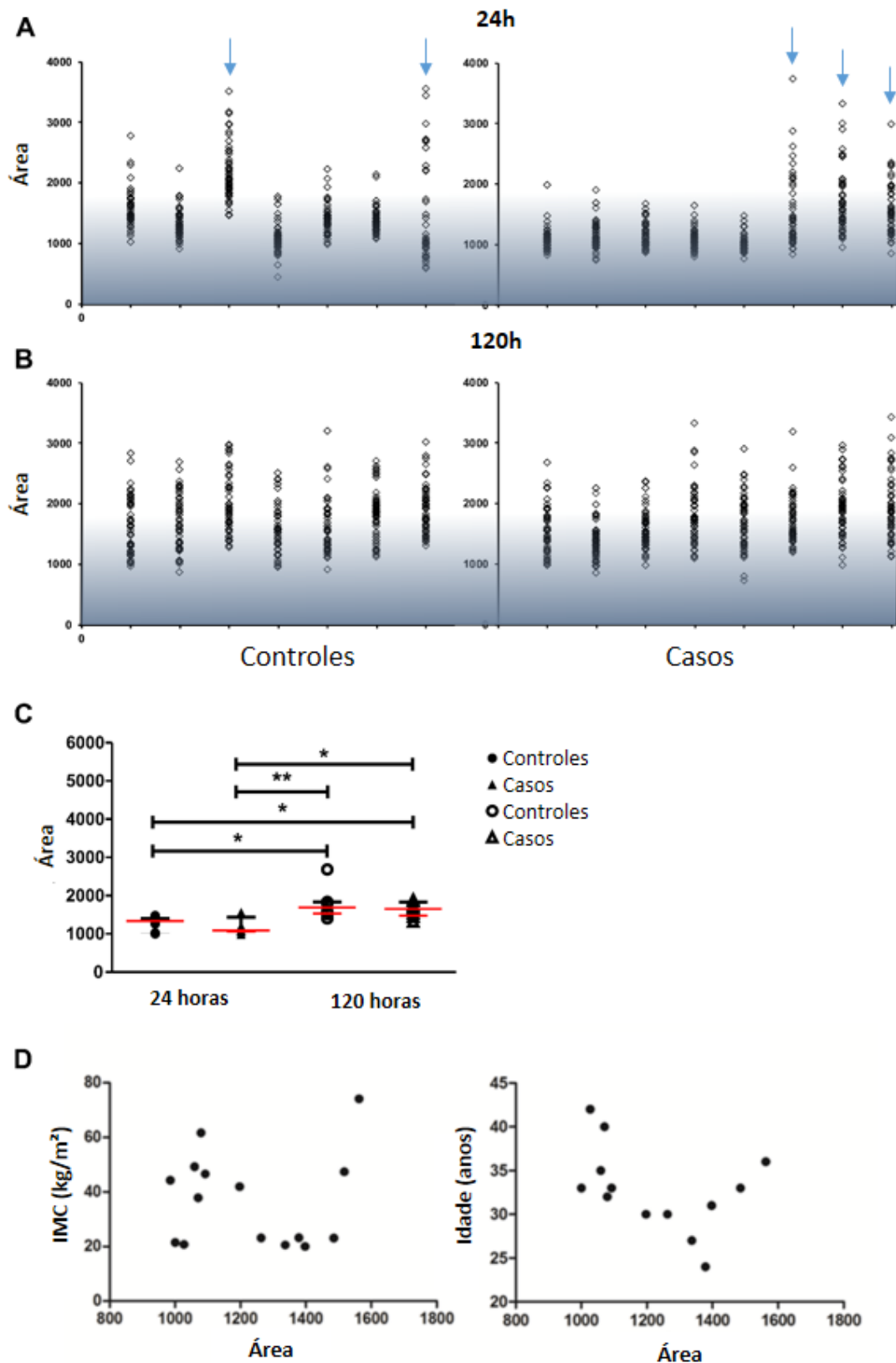


Figura 6. Análises de área de núcleos por NMA. As PBMC foram tratadas com plasma do grupo controle (n = 7, acima) ou plasma de indivíduos com obesidade (n = 8, abaixo) por 4 horas e analisadas. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos núcleos (50) de grupo controle

(esquerda) e caso (direita) após A) 24 ou B) 120 horas de cultura por indivíduo. C) Gráfico de dispersão com mediana (vermelho) e intervalo interquartil (25-75) de grupo controle ou obeso em 24 horas ou 120 horas de cultura. As análises foram realizadas com teste o Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$ (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$). D) Ausência de correlação via teste de correlação de Pearson entre área de núcleos e IMC (Kg/m^2) (esquerda) ou idade ($r = 0,04827$ e $r = - 0,4049$) (direita), respectivamente).

5.4 *Modulação de leucócitos para o perfil imunosenescente pela expressão do marcador de superfície CD28.*

Para verificar se os dados gerados pela análise de NMA poderiam ser confirmados por outras técnicas, realizamos FACS para marcadores associados com o perfil imunosenescente após 120 horas de cultura. Observamos uma diminuição mediana da intensidade de fluorescência (MFI) na população $\text{CD4}+\text{CD28}+$ das células incubadas com o plasma de indivíduos portadores de obesidade quando comparados com as tratadas com plasma de indivíduos controles ($P = 0,01$), indicando redução significativa na expressão da molécula CD28. A modulação ao perfil imunosenescente também foi observada nos linfócitos $\text{CD8}+\text{CD28}+$ e foi estatisticamente significativa quando analisados quanto à percentagem de células ($P < 0,01$) ou MFI ($P < 0,05$) (**Fig. 7A**). Gráficos representativos são mostrados (**Fig. 7B**).

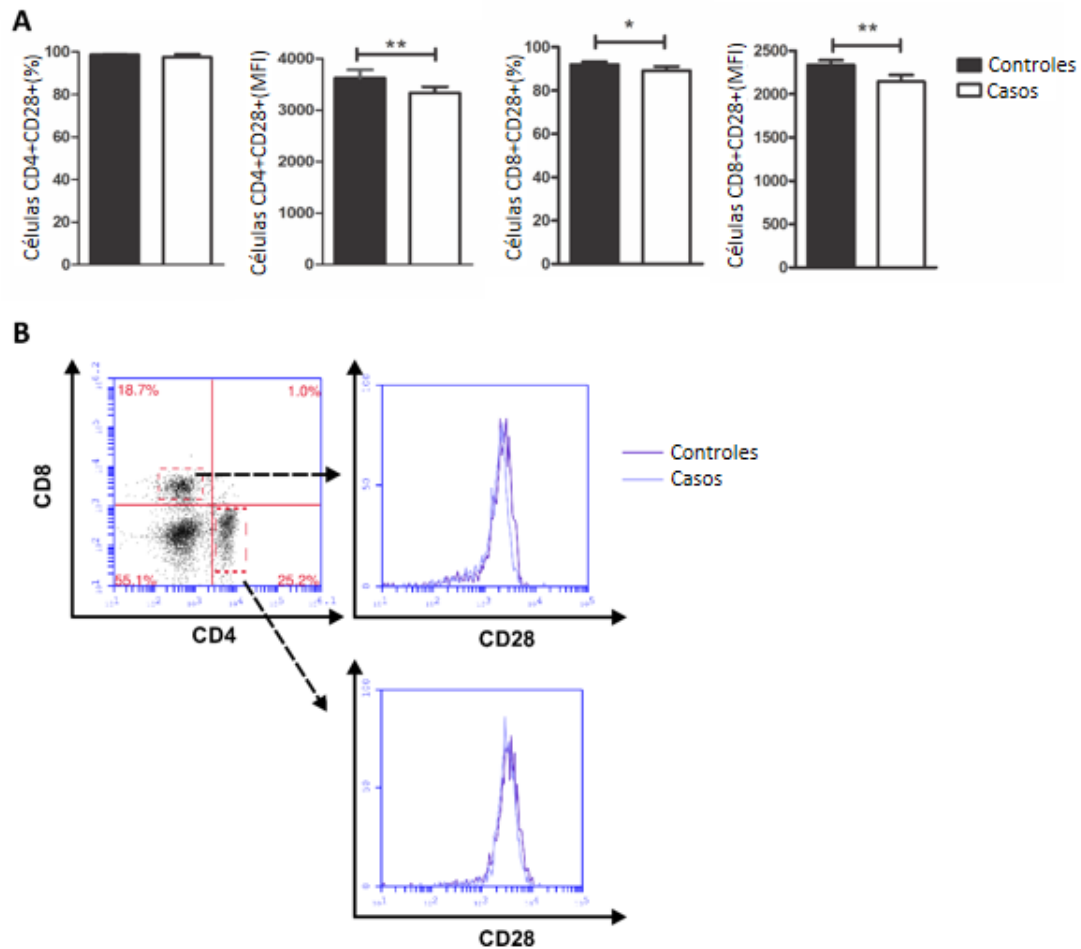


Figura 7. Redução da expressão de CD28, marcador de superfície negativamente correlacionado com o perfil de imunosenescência. PBMC foram tratadas por 4 horas com plasma de indivíduos controle ($n = 9$) ou portadores de obesidade ($n = 9$) e analisadas após 120 horas de cultura. As células foram marcadas para CD4, CD8 e CD28 após a cultura. A) Gráfico de barras. B) Gráfico de ponto (esquerda) e histogramas (direita) representativos das análises realizadas. Os dados representam média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas via teste t de Student e diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. MFI: Mediana da intensidade de fluorescência. (* $P = 0,05$ e ** $P < 0,01$).

5.5 O plasma de indivíduos com obesidade aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias observadas no fenótipo SASP

O perfil SASP está associado com a modulação no secretoma das células. Assim, quantificamos no sobrenadante de PBMCs tratadas por 4 horas e cultivadas por 24 e 120 horas adicionais a expressão de certas citocinas pró-inflamatórias. Não observamos

diferença significativa na expressão das citocinas analisadas a partir da cultura de PBMC intactas com plasma de indivíduos controles ou portadores de obesidade após 24 horas de cultura (**Fig. 8A**). Entretanto, a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (P = 0,04) e IL-8 (P = 0,02) foi significativamente maior nas PBMC incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade após 120 horas de cultura. A expressão de TNF- α foi similar entre os dois tratamentos (casos x controles) após 24 e 120 horas, mas sofreu uma diminuição após 120 horas em cultivo em relação ao tempo de 24 horas (**Fig. 8A**). Curiosamente IL-6, uma citocina chave no perfil SASP não foi significativamente alterada (P = 0,07) após 120 horas de cultura. Para verificar se havia alguma alteração na modulação de PBMC saudáveis após um maior tempo de exposição ao plasma de indivíduos obesos, incubamos as PBMCs do indivíduo eutrófico não relacionado com RPMI contendo 10% de plasma de indivíduos com obesidade e controles por 24h (as culturas não se mantiveram viáveis quando mantidas por mais tempo em exposição ao plasma). Observamos então um aumento significativo na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (P = 0,04), IL-6 (P = 0,02) e IL-8 (P = 0,05) e da citocina regulatória IL-10 (P = 0,04) em células incubadas com plasma de pacientes com obesidade em relação ao controle (**Fig. 8B**). Esse aumento corrobora com a ideia de indução de um perfil pró-inflamatório nessas células, possivelmente em resposta à um perfil semelhante já relatado na literatura para plasma de pacientes com obesidade. Curiosamente, a expressão de TNF- α não apresentou diferença significativa entre os grupos nesse caso. A expressão das citocinas após 24 ou 120 horas foi corrigida pelo ensaio de MTT.

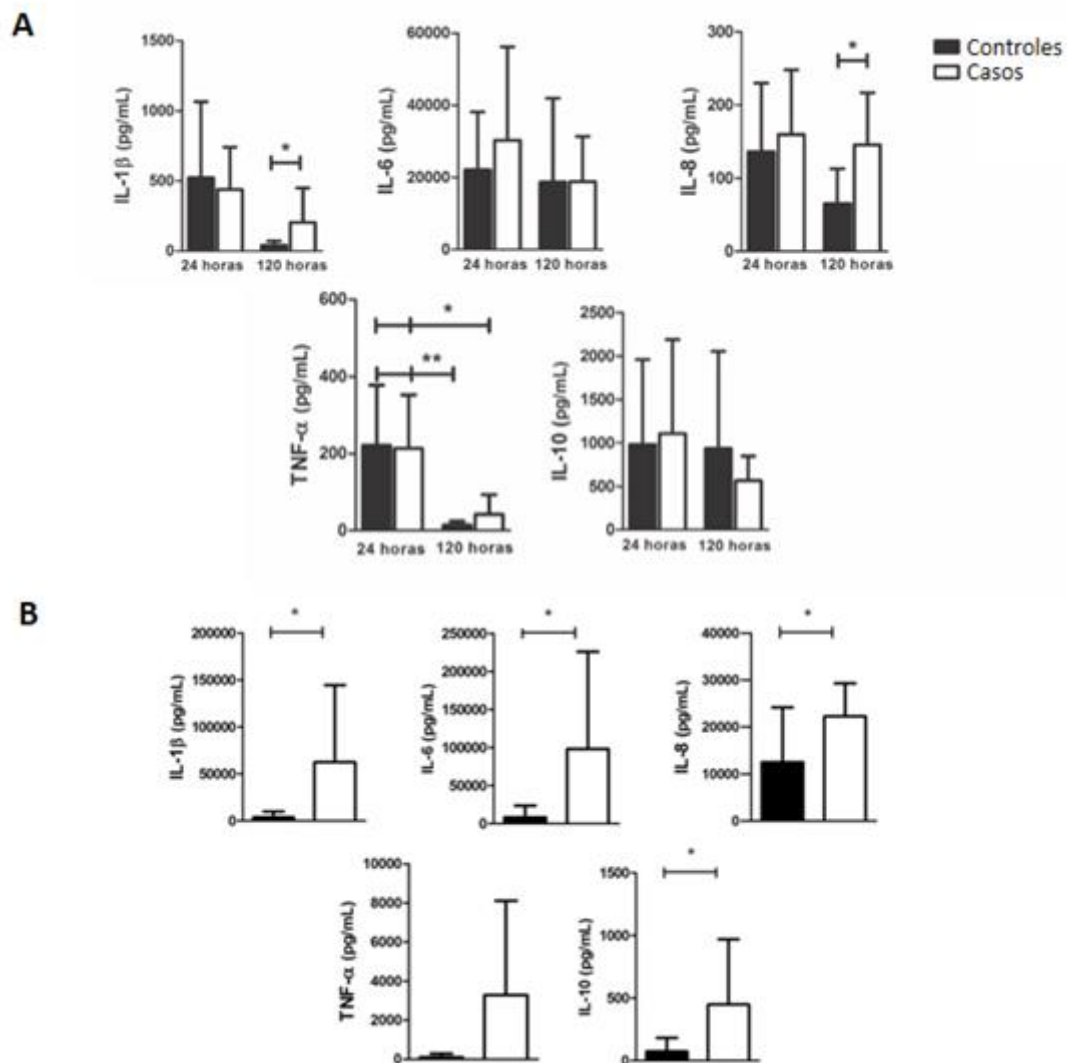


Figura 8. Alterações na expressão de citocinas em PBMCs incubadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade. A) Quantificação da secreção de citocinas (por CBA) após 4 horas de estímulo de PBMC com plasma de indivíduos controles (n = 9) ou com obesidade (n = 9) e analisadas após 24 ou 120 horas em cultura. B) Quantificação da secreção de citocinas após 24 horas de estímulo de PBMC com plasma de indivíduos controle (n = 9) ou com obesidade (n = 9) e analisadas após 24 horas. Dados representam média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas via teste t de Student ou Mann-Whitney e diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$).

5.6 A cultura de PBMC com plasma de indivíduos com obesidade diminui a expressão do marcador p21^{CIP1}

A proteína p21^{CIP1} desempenha um papel fundamental na indução da parada de ciclo celular em G1 em resposta à danos ao DNA após ativação e sinalização via p53. p21^{CIP1} pode sinalizar as células para um perfil de morte celular por apoptose ou senescência. Para determinar se houve mudança na expressão do marcador p21^{CIP1} nas PBMC tratadas, realizamos experimentos de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR). Supreendentemente nossos resultados, demonstram a expressão gênica reduzida de p21^{CIP1} entre os dois grupos após 120 horas de cultura (**Fig. 9**).

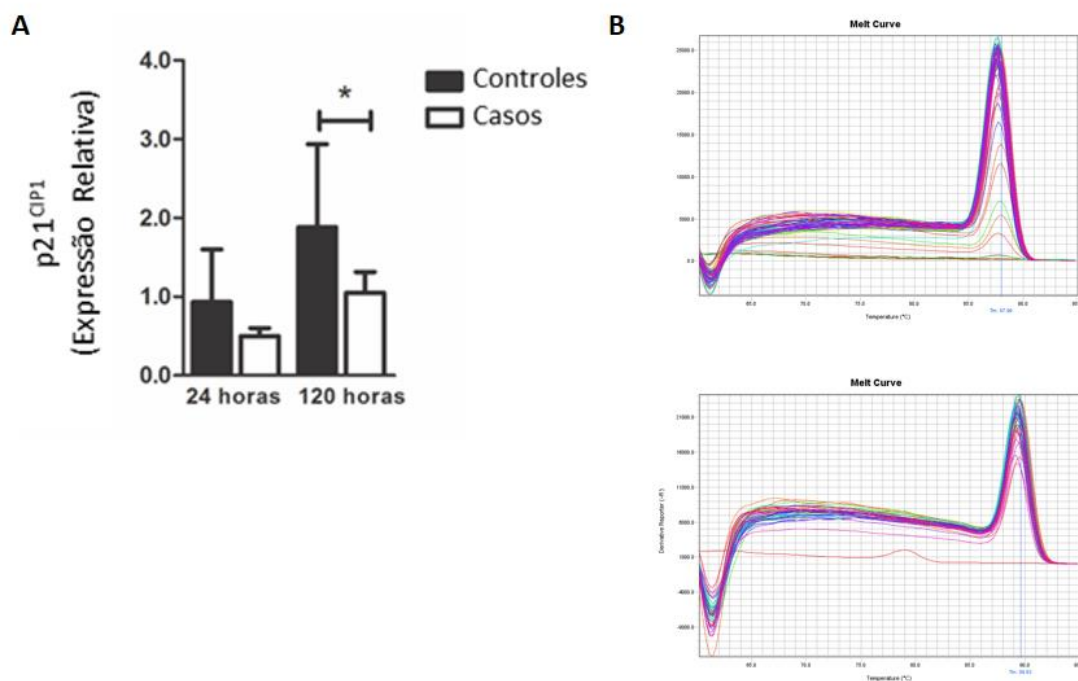


Figura 9. Expressão gênica diminuída de p21CIP1 em PBMCs incubadas com plasma de indivíduos obesos por 120 horas. A) Gráfico de barras de expressão gênica relativa obtida pelo cálculo $\Delta\Delta CT$. Os dados representam mediana \pm desvio padrão. As análises foram realizadas pelo teste Mann-Whitney e consideradas significativas quando $P < 0,05$ (* $P = 0,047$). B) Pico único

observado na curva de dissociação que demonstra a especificidade da reação de PCR para o gene controle endógeno GNB2L1 (acima) e o gene de interesse p21^{CIP1} (abaixo).

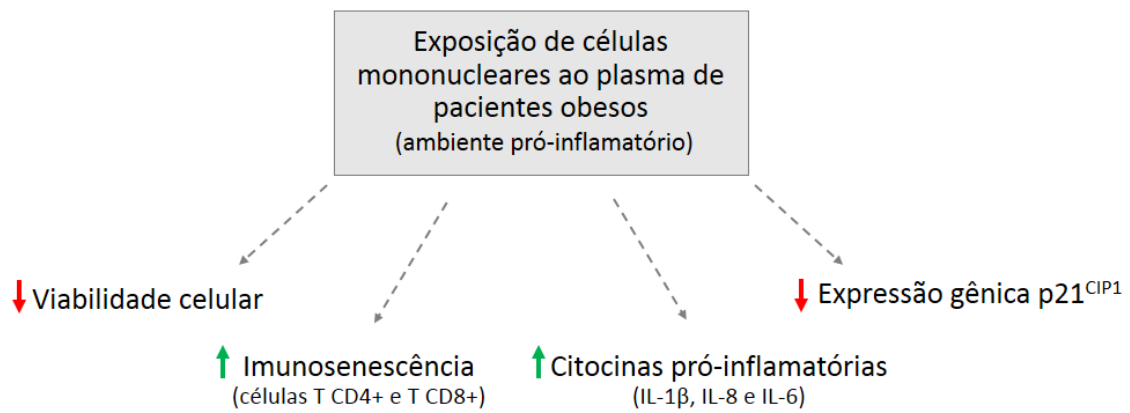


Figura 10. Esquema ilustrando os principais resultados encontrados no presente estudo.

6. DISCUSSÃO

Trabalhos recentes têm demonstrado uma relação cada vez mais próxima entre o envelhecimento e o perfil de inflamação sistêmica observado em diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como doenças cardiovasculares e metabólicas, câncer [4, 5]. Comum a essas doenças é o estado de inflamação crônica persistente, mesmo que de baixo grau, que quando se manifesta prematuramente podem acelerar mecanismos celulares e moleculares direcionando o indivíduo para um estado de envelhecimento precoce, denominado “*inflammaging*”. Não se sabe ao certo se a cronicidade da inflamação é responsável pelo aparecimento das DCNT ou ao contrário, porém, parece existir relação causal entre a expansão exacerbada do tecido adiposo, promoção da inflamação e envelhecimento celular sistêmico precocemente induzido nesses indivíduos [11].

Nosso trabalho consistiu na incubação de células mononucleares intactas com plasma de indivíduos portadores de obesidade por um período curto de tempo (4 horas) e observação após 24 e 120 horas. Nossos resultados apontam uma redução significativa na viabilidade celular de PBMCs expostas ao plasma de pacientes com obesidade em relação aos controles. Essa redução foi acompanhada pela modulação de linfócitos T auxiliares (T CD4+) e T citotóxicos (CD8+ para um perfil imunosenescente com secreção aumentada de algumas citocinas pró-inflamatórias e redução da capacidade de regular uma resposta inflamatória. Esses dados complementam resultados paralelos obtidos pelo nosso grupo, os quais apontam uma maior quantidade de células mononucleares em apoptose inicial (Parisi, M.M., manuscrito pronto para submissão), possivelmente causada pelo ambiente pró-oxidativo e genotóxico decorrente da presença de plasma

de indivíduos portadores de obesidade (Grun, L.K., manuscrito em preparação) nas culturas.

A indução e persistência de células senescentes no adulto diminui a capacidade de reparo do organismo e compromete a homeostasia tecidual. A senescência celular pode ser induzida por diferentes estressores como dano oxidativo, dano ao DNA, ambiente pró-inflamatório e encurtamento de telômeros, entre outros. Além disso, o envelhecimento, precoce ou não, do organismo está associado com uma vulnerabilidade aumentada a infecções [27, 28], elevada incidência de tumores, ocorrência de processos auto-imunes [29] e resposta reduzida a novos antígenos, exemplificado pela resposta diminuída a vacinas. A inabilidade do sistema imune adaptativo de lidar com novos antígenos e gerar uma resposta imune protetora é uma característica da imunosenescência e está associado com maior morbidade e mortalidade [11, 29].

As células do sistema imune, especialmente os macrófagos presentes no sistema imune inato, são essenciais para a eliminação das células senescentes [36]. Em modelo experimental, foi demonstrado que a remoção de células senescentes por técnicas de biologia molecular adia o aparecimento de características ao envelhecimento como sarcopenia, cataratas e perda de tecido adiposo [37]. Porém, o microambiente alterado induzido pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo característico da obesidade e mudanças endócrinas e sistêmicas está associado com a ativação crônica das células do sistema imune, o que pode acarretar na morte ou entrada em senescência precoces nessas células. O comprometimento do sistema imune induzido pelo acúmulo de células imunosenescentes observado na obesidade pode levar ao aumento da inflamação e do estresse oxidativo, o que pode resultar em perda de homeostase tecidual [17, 32]. A

redução de longevidade e expectativa de vida observada nesses pacientes pode ser revertida através da restrição calórica, a qual reduz o acúmulo de células senescentes [27-29] e suprime a inflamação crônica [35].

Na obesidade, há um grande acúmulo de células senescentes no tecido adiposo, podendo haver um aumento de até 30 vezes no número de pré-adipócitos senescentes em relação indivíduos não obesos [13]. Estas células apresentam elevada secreção de uma série de citocinas pró-inflamatórias que, associadas a outras moléculas, constituem o SASP [13] e contribuem para a indução de senescência a nível sistêmico. Esse “envelhecimento contagioso” é corroborado pelos nossos resultados, que demonstram um aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ senescentes e uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias tipicamente associadas ao SASP por células mononucleares.

Conforme citado anteriormente, os nossos resultados confirmam o perfil imunosenescente [30] diante de um ambiente pró-inflamatório. Observamos uma modulação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para um perfil senescente com diminuição da molécula co-estimuladora CD28 após 120 horas em cultivo. A moléculas CD28 cumpre um papel fundamental na ativação de linfócitos T (CD4 e CD8) através de um sinal co-estimulatório. Porém, há perda progressiva e irreversível de CD28 ao longo de envelhecimento nestas células, permitindo sua utilização como marcador de senescência em linfócitos T [31]. Entretanto, o perfil pró-inflamatório crônico - ou *inflammaging* - presente em pacientes com obesidade mantém as células do sistema imune em constante ativação e ao mesmo tempo compromete sua função através da indução precoce de senescência. Ao mesmo tempo, a senescência de células não-

imunes também pode contribuir para a imunosenescência, podendo, entre outras alterações, levar a exaustão do mecanismo de expansão clonal de células T e B.

Os nossos ensaios demonstraram um aumento das citocinas IL-1 β e IL-8 diante a exposição de um insulto agudo de 4 horas com plasma de pacientes obesos, além do aumento de IL-6 após 24 horas de estímulo. IL-1 β , IL-8 e IL-6 são consideradas as principais componentes sinalizadoras do SASP [11]. Além disso, IL-6 e IL-8 são importantes ativadores de células do sistema imune inato, cuja função é eliminar o não-próprio através da secreção de moléculas pró-oxidantes. Logo, a expressão crônica dessas citocinas pode levar desregulação da atividade do sistema imune inato e induzir dano celular em outros tecidos do próprio organismo [14]. IL-6 parece ser a citocina que sofre maior o aumento de expressão entre as moléculas que compõem o SASP durante a senescência, possivelmente induzido por sinalizações constantes de dano ao DNA [11]. Concomitante a isso, a literatura aponta uma produção aumentada de IL-6 no tecido adiposo durante a obesidade, cujo aumento se reflete a nível sistêmico [20] e tem sido relacionado com o aumento da vulnerabilidade do sistema imune [16]. Juntos, esses dados parecem indicar que o aumento que observamos na secreção de IL-8 (bem como das demais citocinas associadas ao SASP) por células mononucleares pode ser induzido pela maior da expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IL-6, no plasma dos pacientes com obesidade em consequência do acúmulo exacerbado de células senescentes no tecido adiposo.

Além disso, macrófagos em um ambiente pró-inflamatório, quando ativos, tendem a secretar TNF, IL-1 β e IL-6 [26]. Assim a secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias circulantes é multifatorial e envolve o aumento de pré-adipócitos

senescentes, infiltração de monócitos e diferenciação no perfil de macrófagos com características de inflamação no tecido adiposo e maior acúmulo de células senescentes.

O aumento da expressão de IL-10, observado após 24 horas de estímulo com plasma de pacientes obesos, é por muitas vezes associado a uma resposta anti-inflamatória, embora seu papel seja um pouco controverso [18]. Essa redução pode representar um mecanismo compensatório, uma tentativa da célula de reverter o perfil pró-inflamatório representado por IL-8, IL-6 e IL-1 β . Esse mecanismo é sugerido na literatura através de estudos que apontam uma correlação positiva entre IL-6 e IL-10 [12], ou seja, o estímulo de macrófagos *in vitro* com IL-6 acarretaria no aumento da secreção de IL-10 por estas células [25]. Isso refletiria a capacidade de imunomodulação presente nessas células, em resposta ao perfil pró-inflamatório induzido pelo plasma de portadores de obesidade. Em contraponto, a literatura sugere uma diminuição na expressão de IL-10 com o avanço da idade [15], portanto, o aumento de IL-10 parece estar associado a uma resposta inicial da célula (incubada apenas por 24 horas com plasma), o qual pode ser suprimido pelo desbalanço pró-inflamatório crônico observado tanto na obesidade [7] quanto no envelhecimento [19].

Por fim, não existe na literatura técnicas consenso aceitas e validadas para a identificação de células senescentes *in vivo* ou associadas com sua funcionalidade. Os ensaios mais comuns envolvem a detecção da atividade da enzima lisossomal da enzima β -galactosidase associada a senescência (SA- β -gal) [44] como marcador de senescência ou expressão das proteínas p53, p21^{CIP1} ou p16^{INK4a}. Entretanto, os macrófagos, presentes em altas quantidades nas nossas culturas expressam altos níveis de β -galactosidase, dificultando a sua atividade associada com a senescência [45]. Por outro lado, os linfócitos T expressam também a proteína p16^{INK4a} não associado com

senescência. Entretanto, as células senescentes modificam sua morfologia e apresentam aumento do volume citoplasmático e nuclear. Com o intuito de investigar a utilização de parâmetros de morfologia nuclear e corroborar nossos dados acerca do acúmulo de células imunosenescentes através da diminuição da expressão de CD28, utilizamos uma outra ferramenta para a possível identificação de células em senescência ou apoptose baseada em alterações na morfometria nuclear.

Esse ensaio busca quantificar a partir de parâmetros de tamanho e morfologia celular células em diferentes estados fisiológicos [23], cujas variações em mitose, senescência e dano mitótico já são há bastante tempo descritas e avaliadas na literatura. Porém, devido à heterogeneidade da nossa população, a qual incluía monócitos, macrófagos e linfócitos T, essas alterações de morfometria não parecem refletir o real estado fisiológico dessas células nem estar de acordo com nossos dados de imunofenotipagem, uma vez que a morfologia nuclear entre esses tipos celulares pode ser heterogênea. Encontramos um único trabalho na literatura que detecta apoptose em culturas de monócitos e macrófago através do aspecto nuclear [46], porém, isso apenas parece ser possível a partir de culturas com alta pureza dessas populações. Uma vez que as nossas culturas representam uma cultura primária heterogênea composta por diversos tipos de leucócitos, não achamos diferenças entre os grupos estudados nos diferentes tempos observados pela da técnica de NMA. É possível que, com o isolamento apropriado e culturas de populações puras seja possível utilizar a técnica de análise morfométrica nuclear para a identificação de diferentes estados fisiológicos em resposta à estresse.

Por outro lado, os monócitos são células com grande plasticidade e sofrem alterações morfológicas e fenotípicas conforme variações de estímulo [46-48]. Monócitos podem ser diferenciados *in vitro* a diferentes estados de ativação, os quais são geralmente separados em pró e anti-inflamatórios, embora haja contradição acerca dessa nomenclatura. Essas alterações são visíveis através de análises de microscopia através da redução da razão núcleo/ citoplasma [42, 47, 48]. Esse estado de ativação pode variar pela exposição a diferentes citocinas, como IL-6, tipicamente associada com obesidade [49] e mesmo diante de diferentes combinações dessas citocinas [47]. Logo, essa plasticidade de resposta característica de monócitos pode ser um empecilho para edificação de estados fisiológicos por morfometria nuclear, embora não pareçam haver dados apontando alterações na morfologia do núcleo durante essa diferenciação.

Afim de explorar as vias de resposta das células imunosenescentes, buscamos investigar mecanismos de sinalização de senescência induzidos pelo nosso tratamento. A proteína p21^{CIP1} é um inibidor de cinases dependentes de ciclina (CDKs) cuja expressão é estimulada após fosforilação de p53 e em resposta à estresse genotóxico, ou seja, induzida por dano ao DNA [45] e promove a parada reversível do ciclo celular. A ativação de p53 promove subsequentemente a ativação de p21^{CIP1}, a qual também tem sido associada com parada de ciclo celular prolongada em resposta à dano crônico ao DNA através da ativação de p53. Assim a via p53/p21 pode desempenhar um papel importante na sinalização de senescência celular, embora seu papel ainda permaneça um pouco controverso [45]. Nossos resultados apontaram uma redução significativa na expressão gênica de p21^{CIP1} em células incubadas com plasma de pacientes com obesidade após 120 horas de cultivo quanto comparadas ao grupo controle. Essa observação está de acordo com dados prévios (Parisi, M.M., manuscrito pronto para

submissão) demonstrando uma diminuição na sinalização e por conseguinte fosforilação da proteína p53 por FACS. A proteína p21^{CIP1} é hoje considerada um marcador associado com o início do mecanismo de senescência celular e não com sua manutenção, embora outros mecanismos associados com o estabelecimento de senescência e independente de p53 sejam possíveis [37]. Nesse sentido, pretendemos investigar futuramente a expressão de p16^{INK4A} e GATA-4 nessas células, uma vez que são considerados importantes marcadores de senescência celular e independentes da via p53.

7. CONCLUSÕES

1. Nossos resultados apontam para uma redução da viabilidade de células mononucleares intactas após incubação com plasma de indivíduos portadores de obesidade;
2. Não foram observadas diferenças entre percentagem de PBMC de células senescentes quando utilizamos os dados de morfometria nuclear;
3. O fenótipo das PBMCs foi modulado para um perfil associado com senescência pela diminuição da molécula co-estimuladora CD28 e aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e IL-6);
4. Observamos uma redução da proteína p21^{CIP1} nas culturas tratadas com o plasma de indivíduos portadores de obesidade.

8. PERSPECTIVAS

1. Validar os achados através da expressão da enzima β -galactosidase associada a senescência (SA- β -gal) em culturas puras e heterogêneas de células mononucleares;
2. Explorar a expressão de outros genes associados com apoptose e senescência como p53, p16^{INKA4} e GATA-4;
3. Manter as culturas por um tempo maior para determinar o tempo necessário para a indução do fenótipo senescente (SASP);
4. Aumentar o tamanho da amostra para correlacionar senescência com diferentes comorbidades presentes na nossa amostra de pacientes portadores de obesidade.

9. REFERÊNCIAS

- [1] López-Otín, C.; Blasco, M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of aging. *Cell*, 153(6): 1194–1217, 2013.
- [2] Barbé-Tuana, F. M.; Parisi, M. M.; Panizzutti, B. S.; Fries, G. R.; Grun, L. K.; Guma, F. T.; Kapczinski, F.; Berk, M.; Gama, C. S.; Rosa, A. R. Shortened telomere length in bipolar disorder: a comparison of the early and late stages of disease. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38(4):281-286, 2016.
- [3] Czepielewski, L. S.; Massuda, R.; Panizzutti, B.; da Rosa, E. D.; de Lucena, D.; Macêdo, D.; Grun, L. K.; Barbé-Tuana, F. M.; Gama, C.S. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophrenia Research*, 174(1-3):39-42, 2016.
- [4] Ahima, R. S. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature Medicine* 15, 996 – 997, 2009.
- [5] Tzanetakou, I. P.; Katsilambros, N. L.; Benetos, A.; Mikhailidis, D. P.; Perrea, D. N. “Is obesity linked to aging?”: Adipose tissue and the role of telomeres. *Ageing Research Reviews*, 11(2):220-9, 2012.
- [6] Grun, L. K. Padronização da técnica de pcr em tempo real para a determinação do comprimento relativo de telômeros em diferentes desordens associadas ao envelhecimento. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- [7] Storer, M.; Mas, A.; Robert-Moreno, A.; Pecoraro, M.; Ortells, M. C.; Di Giacomo, V.; Yosef, R.; Pilpel, N.; Krizhanovsky, V.; Sharpe, J.; Keyes, W. M. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 21;155(5):1119-30, 2013.
- [8] Aw, D.; Silva, A. B.; Palmer, D. B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population *Immunology*, 120(4):435-46, 2007.
- [9] Franceschi, C.; Capri, M.; Monti, D.; Giunta, S.; Olivieri, F.; Sevini, F.; Panourgia, M. P.; Invidia, L.; Celani, L.; Scurti, M.; Cevenini, E.; Castellani, G. C.; Salvioli, S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1):92-105, 2007.

- [10] Baylis, D.; Bartlett, D. B.; Patel, H.; Robert, H. C. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longevity & Healthspan*, 2: 8, 2013.
- [11] Franceschi, C. & Campisi, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69 Suppl 1:S4-9, 2014.
- [12] Montecino-Rodriguez, E.; Berent-Maoz, B.; Dorshkind, K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3):958-65, 2013.
- [13] Gruver, A. L.; Hudson, L. L.; Sempowski, G. D. Immunosenescence of ageing. *The Journal of Pathology*, 211(2):144-56, 2007.
- [14] Valdes, A. M.; Andrew, T.; Gardner, J. P.; Kimura, M.; Oelsner, E.; Cherkas, L. F.; Aviv, A.; Spector, T. D. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *The Lancet*, 20-26; 366(9486):662-4, 2005.
- [15] Kershaw, E. E. & Flier, J. S. The adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6):2548-56, 2004.
- [16] Schipper, H. S.; Prakken, B.; Kalkhoven, E.; Boes, M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8):407-15, 2012.
- [17] Deng, T.; Lyon, C. J.; Bergin, S.; Caligiuri, M. A.; Hsueh, W. A. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11: 421-449, 2016.
- [18] Rial, N. S.; Choi, K.; Nguyen, T.; Snyder, B.; Slepian, M. J. Nuclear factor kappa B (NF- κ B): a novel cause for diabetes, coronary artery disease and cancer initiation and promotion? *Medical Hypotheses*, 78(1):29-32, 2012.
- [19] Chien, Y.; Scuoppo, C.; Wang, X.; Fang, X.; Balgley, B.; Bolden, J.E.; Premririt, P.; Luo, W.; Chicas, A.; Lee, C. S.; Kogan, S. C.; Lowe, S. W. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development*, 25(20):2125-36, 2011.
- [20] Karaman, A.; Aydın, H.; Geçkinli, B.; Çetinkaya, A.; Karaman, S. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 782:30-5, 2015.

- [21] Marseglia, L.; Manti, S.; D'Angelo, G.; Nicotera, A.; Parisi, E.; Di Rosa, G.; Gitto, E.; Arrigo, T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International Journal of Molecular*, 16(1): 378–400, 2015.
- [22] Coppé, J. P.; Desprez, P. Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology*, 5: 99–118, 2010.
- [23] Jeck, W. R.; Siebold, A. P.; Sharpless, N. E. Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell*, 11(5):727-31, 2012.
- [24] Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4):402-8, 2001.
- [25] 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.
- [26] NMA - Nuclear Morphometric Analysis spreadsheets. Disponíveis em <<http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>> Acesso em 22 de novembro, 2016.
- [27] Huttunen, R.; Syrjanen, J. Obesity and the risk and outcome of infection. *International Journal of Obesity*, 37(3):333-40, 2013.
- [28] Sheridan, P. A.; Paich, H. A.; Handy, J.; Karlsson, E. A.; Hudgens, M. G.; Sammon, A. B., et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity*, 36(8):1072-7, 2012.
- [29] De La Fuente, M. & De Castro, N. M. Obesity as a Model of Premature Immunosenescence. *Current Immunology Reviews*, 8: 63-75, 2012.
- [30] Tchkonja, T.; Morbeck, D. E.; von Zglinicki, T.; van Deursen, J.; Lustgarten, J.; Scoble, H.; Khosla, S.; Jensen, M. D.; Kirkland, J. L. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*, 9(5): 667–684, 2010.
- [31] Qin, L.; Jing, X.; Qiu, Z.; Cao, W.; Jiao, Y.; Routy, J. P.; Li, T. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging (Albany NY)*, 8(5):848-59, 2016.
- [32] Pintus, F.; Floris, G.; Rufini, A. Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany, NY)*, 4(11):734-41, 2012.
- [33] Fontana, L.; Partridge, L.; Longo, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328(5976):321-6, 2010.

- [34] Wang, C.; Maddick, M.; Miwa, S.; Jurk, D.; Czapiewski, R.; Saretzki, G., et al. Adult-onset, short-term dietary restriction reduces cell senescence in mice. *Aging (Albany, NY)*, 2(9):555-66, 2010.
- [35] Piccio, L.; Stark, J. L.; Cross, A. H. Chronic calorie restriction attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4):940-8, 2008.
- [36] Mevorach, D.; Trahtemberg, U.; Krispin, A.; Attalah, M.; Zazoun, J.; Tabib, A.; Grau, A.; Verbovetski-Reiner, I. What do we mean when we write senescence, "apoptosis," "necrosis," or "clearance of dying cells"? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209:1-9, 2010.
- [37] Baker, D. J.; Wijshake, T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N. K.; Childs, B. G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J. L.; van Deursen, J. M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372):232-6, 2011.
- [38] Freund, A.; Orjalo, A. V.; Desprez, P. Y.; Campisi J. Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences. *Trends in Molecular Medicine*, 16(5):238-46, 2010.
- [39] Starr, M. E.; Evers, B. M.; Saito, H. Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6. *Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(7):723-30, 2009.
- [40] Mocellin, S.; Panelli, M. C.; Wang, E.; Nagorsen, D.; Marincola, F. M. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology*, 24-1, 2003.
- [41] Pereira, S.; Teixeira, L.; Aguilar, E.; Oliveira, M.; Savassi-Rocha, A.; Pelaez, J. N.; Capettini, L.; Diniz, M. T.; Ferreira, A.; Alvarez-Leite, J. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF- β in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition*, 30(7-8):784-90, 2014.
- [42] Fernando, M. R.; Reyes, J. L.; Iannuzzi, J.; Leung, G.; McKay, D. M. The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PLoS One*, 15;9(4):e94188, 2014.
- [43] Zhang, B.; Bailey, W. M.; Braun, K. J.; Gensel, J. C. Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 273:83-91, 2015.
- [44] Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubeli, I.; Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human

cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20): 9363–9367, 1995.

[45] Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7):397-408, 2015.

[46] Daigneault, M.; Preston, J. A.; Marriott, H. M.; Whyte, M. K.; Dockrell, D. H. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One*, 13;5(1):e8668, 2010.

[47] Xu, W.; Zhao, X.; Daha, M. R.; van Kooten, C. Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology*, 53(3):179-86, 2013.

[48] Parisi, M. M. Padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo da diferenciação *in vitro* de macrófagos. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

[49] Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J. D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12):1798-806, 2009.

[50] Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual [Internet], Maio, 2013.

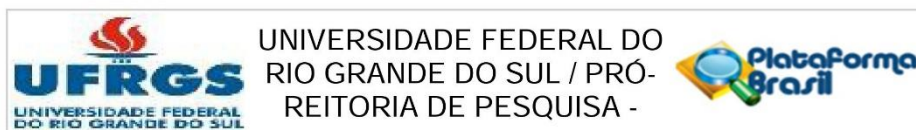
[51] Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805-20, 2010.

[52] Oishi, Y. & Manabe, I. Integrated regulation of the cellular metabolism and function of immune cells in adipose tissue. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(3):294-303, 2016.

[53] WHO (World Health Organization). Obesity and overweight, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

[54] Ishii, K. J.; Coban, C.; Kato, H.; Takahashi, K.; Torii, Y.; Takeshita, F.; Ludwig, H.; Sutter, G.; Suzuki, K.; Hemmi, H.; Sato, S.; Yamamoto, M.; Uematsu, S.; Kawai, T.; Takeuchi, O.; Akira, S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature Immunology*, 7(1):40-8, 2006.

ANEXO I - PARECER APROVADO DO CEP DA 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:

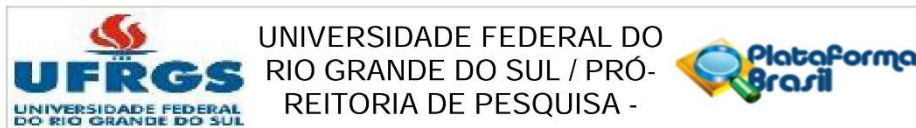
Possui mérito.

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)

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

ANEXO II – PARECER APROVADO DO CEP DA PUC/RS

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@pucls.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

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo para conhecer melhor sobre o quanto o sobrepeso afeta medidas de envelhecimento celular em pessoas com obesidade de grau II (obesos mórbidos) submetidos à cirurgia bariátrica no período transoperatório e em voluntários saudáveis.

A obesidade mórbida – ou obesidade de grau II – definida pelo IMC ≥ 35 , é uma grave condição crônica de saúde que não tem uma causa única. Dentre os efeitos nocivos, a obesidade tem sido associada ao maior risco de desenvolver doenças como diabetes, hipertensão e câncer, afetando substancialmente a qualidade de vida do portador, além de possuírem uma expectativa de vida reduzida.

Apesar da importância de sabermos quais são os efeitos da obesidade, ainda são poucos os estudos que avaliaram esses efeitos sobre medidas genéticas de envelhecimento celular.

O conhecimento dos efeitos da obesidade mórbida sobre a degradação do DNA durante o processo de envelhecimento celular pode trazer amplos benefícios em termos de saúde pública, no que diz respeito à criação de medidas que objetivem evitar e controlar o excessivo aumento de peso da população em geral, visando à prevenção de diversas doenças associadas à obesidade.

Antes de consentir com sua participação, solicitamos que você leia as informações contidas neste termo de consentimento.

1. QUAL É OBJETIVO PRINCIPAL DO ESTUDO?

O objetivo principal deste estudo é avaliar os efeitos da obesidade mórbida durante o processo de envelhecimento em uma população de obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica, no período transoperatório, e indivíduos saudáveis.

2. COMO O ESTUDO SERÁ REALIZADO E QUAL SERÁ A MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

O paciente, ou responsável legal serão convidados a responder perguntas que revisam aspectos clínicos, sociais e de saúde, do paciente e de seus familiares. Os pacientes serão convidados a responder a dois questionários relacionados à qualidade de vida relacionada à saúde e ambiente familiar (Questionário de Qualidade de Vida-SF-36 e Questionário FACES III).

Esses questionários serão realizados por um entrevistador. Após o preenchimento dos questionários, será solicitada aos pacientes a permissão para a coleta de uma amostra de esfregaço de células da bochecha interna da boca (mucosa

oral) e coleta de 10 ml de sangue do seu braço (sangue periférico). As coletas serão realizadas por uma equipe treinada no período transoperatório.

3. QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Ao participar do nosso estudo você pode auxiliar os pesquisadores a melhorar os conhecimentos sobre a obesidade no Brasil, trazendo benefícios para a prevenção e cuidados para saúde. Estimamos um desconforto mínimo no momento da punção venosa para retirada de sangue ou do esfregaço da bochecha para a obtenção de células da mucosa interna da boca. Não prevemos maiores riscos associados a ditos procedimentos.

4. QUEM TERÁ ACESSO ÀS INFORMAÇÕES DESTE ESTUDO?

Os dados dos questionários e os resultados individuais dos estudos de obesidade são confidenciais e não poderão ser utilizadas para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, porém a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. As amostras biológicas serão armazenadas apenas com seu registro, sem o nome ou iniciais. Somente os pesquisadores poderão identificar a origem das amostras. Os Comitês de Ética e Pesquisa da PUCRS ou da UFRGS poderão ter acesso aos dados da pesquisa para poder assegurar que seus direitos estão sendo protegidos.

5. QUAIS SÃO AS COMPENSAÇÕES DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO?

Não haverá custos para os participantes do estudo. Você também não receberá nenhum pagamento pela participação no trabalho.

6. PODEREI DESISTIR DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Os participantes podem em qualquer momento cancelar sua participação no estudo. Isto não influenciará o andamento do estudo e seus resultados futuramente, nem o tratamento oferecido pela equipe responsável.

7. A QUEM DEVO ME DIRIGIR PARA MAIORES INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA?

Se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante do estudo, você pode ligar e contatar os responsáveis pelo estudo no telefone (51) 3308 5763 e falar com o mestrando Lucas Grun ou a Dra. Florencia Barbé-Tuana. Também pode entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS (51) 3308 3738 ou PUCRS (51) 3320 3345, e contatar os coordenadores Profs. Marcelo Lazzaron Lamers e Wania Aparecida Partata, ou o Prof. Rodolfo Herberto Schneider, respectivamente.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei me retirar do estudo a qualquer momento.

ASSINATURAS

Sua assinatura abaixo demonstra que você recebeu e leu este termo, entendeu todas as informações relacionadas ao estudo proposto, esclareceu suas dúvidas e concordou com a sua participação em nosso estudo.

Nome do paciente (ou responsável)

Se responsável: () mãe () pai () outros: _____

Assinatura

Contatos: () _____
() _____