



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Juliana Magalhães Santos

**Papel da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos
à dieta hiperlipídica**

Rio de Janeiro

2021

Juliana Magalhães Santos

**Papel da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à
dieta hiperlipídica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Castiglione

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S237	<p>Santos, Juliana Magalhães. Papel da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica / Juliana Magalhães Santos. – 2021. 49 f.</p> <p>Orientadora: Raquel Carvalho Castiglione</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.</p> <p>1. Obesidade - Teses. 2. Macrófagos - Teses. 3. Dieta hiperlipídica - Teses. I. Castiglione, Raquel Carvalho. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p> <p>CDU 616-056.25</p>
------	---

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Magalhães Santos

**Papel da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à
dieta hiperlipídica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de março de 2021.

Orientadora: Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Castiglione

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Maria das Graças Coelho de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Doutor Rodrigo Soares Fortunato

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Doutor João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Para minha mãe e meu irmão, todo esforço e dedicação geram resultados satisfatórios, e como tal, dedico a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro, à Deus por me permitir percorrer esse caminho e fechar mais um ciclo da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Raquel Castiglione que esteve comigo em todos os momentos necessários e mais um pouco, por ser paciente nas explicações e correções de cada item necessário.

Também à minha família por estar comigo nesse caminho.

Agradecer as minhas amigas Daniela Signorelli, Rayana Guagliarde, Iasmim Bento e meu companheiro Arthur Fortunato por participarem dessa etapa ao meu lado.

Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Obrigada também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento à minha pesquisa.

Aos envolvidos de forma geral um agradecimento especial para mais um fechamentodessa fase da minha vida.

Agradeço à banca por estar presente em minha avaliação.

Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.

Paulo Freire

RESUMO

SANTOS, Juliana Magalhães. **Papel da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Indivíduos que possuem obesidade apresentam um processo inflamatório crônico de baixo grau, com a presença de grande quantidade de macrófagos classicamente ativados (M1) no tecido adiposo. A irisina possui propriedades anti-inflamatórias e anti diabetogênicas podendo agir como imunomodulador de baixo grau. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à uma dieta hiperlipídica. Camundongos C57Bl/6 foram divididos randomicamente em grupos controle (C) e com dieta hiperlipídica (HL) e mantidos nas respectivas dietas por 30 semanas. Células derivadas da medula óssea foram extraídas e diferenciadas em macrófagos *naive* (M0), posteriormente incubados com concentrações de irisina 20 nM, 50 nM, LPS+IFN- γ (indutor de macrófagos M1) ou IL-4 (indutor de macrófagos M2). O fenótipo dos macrófagos foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação de CD206 e CD301. A produção de nitrito, espécies reativas de oxigênio (ROS), capacidade fagocítica, viabilidade celular e expressão de arginase-1 também foram analisadas. No grupo C e animais com dieta HL, IL-4 e ambas as doses de irisina foram capazes de aumentar o número de células F480⁺CD206⁺, porém sem alteração do número de células F480⁺CD301⁺ e da expressão de arginase-1. A irisina não foi capaz de induzir a produção de nitrito e ROS e de modular a capacidade de fagocitose e a viabilidade celular. irisina foi capaz de desencadear um perfil semelhante ao macrófago diferenciado em M2 por estímulo de IL4 em animais submetidos à dieta hiperlipídica, sugerindo uma possível ação anti-inflamatória desta citocina, e com perspectiva para um potencial terapêutico no controle da obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Macrófago. Irisina. Inflamação.

ABSTRACT

SANTOS, Juliana Magalhães. **Role of irisin in macrophage polarization in mice on high fat diet.** 2021. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

In obese individuals, the chronic low-grade inflammatory process shows constant polarization of classically activated macrophages (M1) in the adipose tissue. Irisin has anti-inflammatory and antidiabetogenic properties and it may be a modulator of inflammation observed in obesity. Our aim was to evaluate the effects of irisin on macrophage polarization in mouse subjected to high fat diet. C57Bl/6 male mice were randomly divided in control (C) and high fat diet (HF) groups and maintained in the respective diet for 30 weeks. Bone marrow derived cells were then extracted and differentiated into *naive* macrophages (M0), that were then incubated with 20 nM, 50 nM of irisin, LPS+IFN- γ (to induce M1 macrophages) or IL-4 (to induced M2 macrophages). Macrophage phenotype was evaluated by flow cytometry through CD206 and CD301 expression. Nitrite and reactive oxygen species (ROS) production, phagocytic capacity, cell viability and arginase-1 expression were also analyzed. On both C and HF animals, IL-4 and both irisin doses were able to increase F480⁺CD206⁺ cells number, however without alteration in F480⁺CD301⁺ cells number and arginase-1 expression. Irisin was not able to induce nitrite and ROS production or to modulate phagocytosis and cell viability. Irisin was able to elicit an IL-4- induced M2-like profile in macrophages in animals subjected to high fat diet, suggesting an anti-inflammatory action of this cytokine with potential therapeutic use in obesity control.

Keywords: Obesity. Macrophage. Irisin. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Prevalência da Obesidade entre Adultos Ambos os Sexos entre 1975 e 2016	15
Figura 2 - Estrutura da irisina formada pela proteólise de FNDC5	18
Figura 3 - Indução da liberação de irisina via proteólise de FNDC5 estimulada pelo exercício físico seguido de aumento de UCP-1.....	19
Figura 4 - Polarização por diferentes estímulos moleculares do macrófago M1	21
Figura 5 - Polarização do macrófago M1 e M2 e suas subclassificações.....	23
Tabela 1 - Componentes das dietas controle e hiperlipídica utilizadas para modelo murino em gramas (g).....	26
Tabela 2 - Composição calórica das dietas controle e hiperlipídica para modelo murino.....	26
Figura 6 - Peso corpóreo dos animais do grupo controle (n=6) e submetidos a dieta hiperlipídica (n=6) durante 30 semanas de tratamento.....	32
Figura 7 - Eficiência alimentar durante 30 semanas de tratamento, em Kcal, dos animais do grupo controle (n=6) e submetidos a dieta hiperlipídica (n=6)	33
Figura 8 - Gating realizado na citometria de fluxo.....	34
Figura 9 - Ensaio de espécie Reativa de Nitrogênio (Nitrito) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM. &&&& Difere de todos os demais grupos (p<0,0001)	35
Figura 10 - Ensaio de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.	36
Figura 11 - Ensaio para fagocitose em células em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.....	36
Figura 12 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.....	37
Figura 13 - Expressão de arginase-1 em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C e HL	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Adenosine monophosphate activated protein kinase
AP1	Ativador de proteína 1
Arg1	Arginase 1
ATL	aspirin-triggered lipoxin
ATP	Adenosina trisfosfato
BMDM	Bone marrow - derived macrophages
CAT	Catalase
CAT - 9	Catalase 9
CD163	Cluster of Differentiation 163
CD206	Cluster of Differentiation 206
CD301	Cluster of Differentiation 301
CD86	Cluster of Differentiation 86
C02	Carbon dioxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle medium
EGF	Epidermal growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FNDC5	Fibronectin type III domain-containing protein 5
G-CSF-1	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GSH-Px	Glutathione peroxidase
HL	Hiperlipidica
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon gama
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12

IL13	Interleucina 13
IL23	Interleucina 23
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRN	Intermediarios reativos de nitrogênio
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF 4	Interferon regulatory factor 4
LDL	Low density lipoproteins
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MRC1	Mannose Receptor C- Type 1
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide	
MYF5	Myogenic factor 5
NED	Naphtylethylenediamine
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Nitric oxide
OMS	Organização mundial da saúde
P38 MAPK	Mitogen-activated protein kinase P38
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PAI 1	Plasminogen inhibitor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor co-activating gamma 1 alpha
PKA	Proteína kinase A
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
real-time PCR	Polymerase chain reaction real time
ROS	Reactive oxygen species
SDS Page	Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SOD 1	Superóxido dismutase 1
SOD	Superóxido dismutase 2

STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TABV	Tecido adiposo branco visceral
TABS	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TLRs	Toll like receptors
TNF α	Tumor necrosis factor
UCP-1	Uncoupling protein 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm ²	Centímetro quadrado
g	Gramas
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
ml	mililitros
M	Molar
ng	nanograma
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
x	Multiplicação
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
±	Mais ou menos
<	Menor que
+	Soma
@	Difere IRI 20
&	Difere de todos os grupos
#	Difere de LPS+IFN-γ
*	Difere do M0

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 OBJETIVOS	25
1.1 Objetivo geral	25
1.2 Objetivos específicos	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Estabelecimento e implantação de um modelo de obesidade com dieta hiper-lipídica em camundongos c57bl/6	26
2.2 Obtenção do meio de diferenciação lcm (meio condicionado de l-929)	27
2.3 Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)	27
2.4 Polarização dos macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)	28
2.5 Citometria de fluxo	28
2.6 Quantificação de proteínas BMDM	29
2.7 Ensaio de imunoblotting e expressão de arginase-1	29
2.8 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	29
2.9 Fagocitose	30
2.10 Espécie reativa de oxigênio (ROS)	30
2.11 Oxido nítrico	31
2.12 Análise estatística	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Ganho de peso e eficiência alimentar	32
3.2 Citometria de fluxo	33
3.3 Ensaio espécie reativa de nitrito	35
3.4 Ensaio de espécie reativa de oxigênio (ROS)	35
3.5 Ensaio de fagocitose	36
3.6 Viabilidade celular (MTT)	37
3.7 Resultado preliminar da expressão de arginase -1	37
4 DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

INTRODUÇÃO

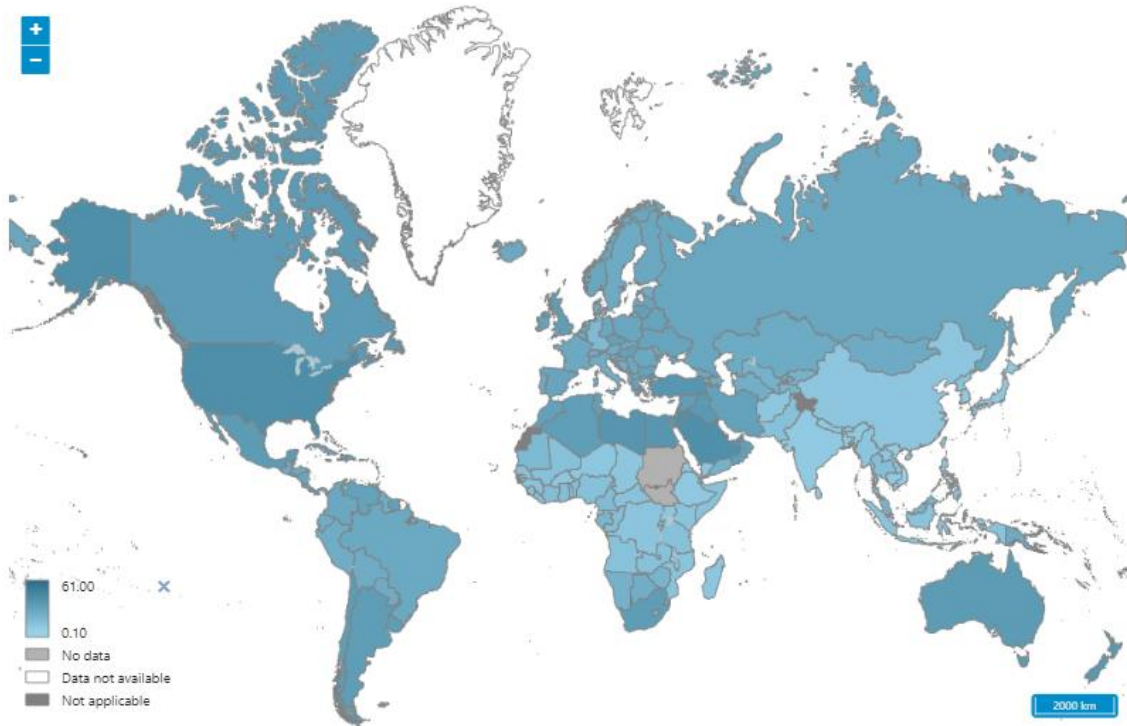
Obesidade

A expansão do tecido adiposo branco caracteriza a obesidade, uma doença grave de cunho público e que envolve principalmente fatores genéticos, ambientais e fisiológicos relacionados ao desequilíbrio entre consumo de calorias e gasto de energia (Spiegelman; Flier, 2001).

O IMC (Índice de Massa Corpórea) é utilizado para obter valores com objetivo de mensurar o nível de sobrepeso e obesidade para ambos os sexos e idades de adultos de determinada população (World Health Organization, 2018). Este é calculado por meio do peso em quilogramas dividido pela altura elevada ao quadrado do indivíduo, sendo que valores entre 25 kg/m^2 e 30 kg/m^2 caracterizam um indivíduo com sobrepeso e valores maiores ou igual a 30 kg/m^2 caracterizam um indivíduo com obesidade (Ministério da Saúde, 2017).

Segundo pesquisas da organização mundial da saúde (OMS), a obesidade é tida como um problema de saúde pública não só no Brasil, mas em todo o mundo. Registros de 2016 mostram que 1,9 bilhões de adultos a partir dos 18 anos de idade estavam acima do peso e, destes, 650 milhões eram obesos, resultando no triplo de casos de obesidade entre os anos de 1975 e 2016. (World Health Organization, 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Prevalência da Obesidade entre Adultos Ambos os Sexos entre 1975 e 2016



Fonte: World Health Organization - Global Health Observatory - Prevalence of Obesity Among Adults.

O desenvolvimento da obesidade pode gerar no indivíduo resistência à insulina local e sistêmica, desenvolvimento de diabetes tipo 2, alterações cardiovasculares e determinados tipos de câncer, assim como, o aumento dos níveis de marcadores do estresse oxidativo e da liberação sistêmica de citocinas pró inflamatórias (Natoli *et al.*, 2018; Shimobayashi *et al.*, 2018).

Exercício físico e dieta alimentar em experimentos com modelos animais são capazes de promover a redução de fatores de risco para desordens metabólicas por meio da diminuição dos níveis de moléculas pró inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α : do inglês *tumour necrosis factor alpha*), Lipopolissacarídeo (LPS), proteína 1 quimioatrativa de monócito (MCP-1 do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) e do estresse oxidativo pelo aumento de proteínas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSHPx: do inglês *glutathione peroxidase*) e catalase-9 (CAT-9), (Korta; Poche, 2019; Natoli *et al.*, 2018). Junto a isto, há um aumento de citocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo, através também da presença de macrófagos anti-inflamatórios (Kawanishi *et al.*, 2010). Tal processo em conjunto com a atividade da irisina possivelmente induz a potencialização destas atividades anti inflamatórias (Kim *et al.*, 2019).

Já se sabe que o exercício físico tem efeito anti-inflamatório e, portanto, pode prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas, se praticado de forma regular. Os possíveis mecanismos para explicar esses achados são: 1) redução da massa gorda visceral; 2) aumento da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias do músculo esquelético em contração; e 3) expressão reduzida de receptores Toll-like (TLRs) em macrófagos (Gleeson *et al.*, 2011).

Além disso, é capaz de estimular a liberação de várias miocinas, algumas das quais são capazes de induzir o escurecimento do tecido adiposo branco, processo que se correlaciona com a melhora das alterações metabólicas durante a obesidade (Niranjan *et al.*, 2019). Dentre essas miocinas está a irisina, uma molécula induzida não apenas pela atividade física, mas também pela exposição ao frio (Vitali *et al.*, 2012), utilizada em nosso estudo.

Tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é formado por tecido conjuntivo frouxo e, embora suas principais células sejam os adipócitos, as quais são responsáveis pelo armazenar de energia na forma de triacilglicerol (TAG), há outros tipos celulares presentes neste tecido. Dentre eles estão os pré adipócitos, células do sistema imune e do sistema nervoso, além de vasos sanguíneos, que interagem contribuindo para as diferentes funções do TA.

Além do armazenamento de energia, este tecido é capaz de secretar diferentes proteínas através dos adipócitos e pré adipócitos (adipocinas) e remodelar o tecido através dos pré adipócitos e macrófagos. O TA possui inervação neural capaz de regular processos metabólicos, como, lipólise via sistema nervoso simpático, com a liberação de ácidos graxos livres, podendo desencadear também a termogênese. E a vascularização, que é fundamental para os processos metabólicos onde há a captação ou liberação de nutrientes (Unamuno; Gema; Victoria, 2018).

A formação do TA é chamada de adipogênese e caracterizada pela formação de adipócitos, processo regulado por diferentes fatores que envolvem a diferenciação do pré adipócito a partir da medula óssea até a formação de adipócitos maduros. Dentre estes fatores estão o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ : do inglês *Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma*), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP- 1c: do inglês *Sterol regulatory element-binding protein 1*) e as proteínas de

ligação ao intensificador CCAAT – C/ EBPs: do inglês *enhancer binding protein*) essenciais na cascata de sinalização transcricional da síntese adipogênica (Tacani *et al.*, 2006).

Há diferentes vias de sinalização que levam à inibição ou ao estímulo da adipogênese. Por exemplo, enzimas como lipase hormônio sensível (HSL: do inglês *hormone sensitive lipase*) e lipase de triglicerol do adipócito (ATGL: do inglês *adipose triglyceride lipase*) podem reduzir o processo de adipogênese devido a uma depressão nutritiva, diminuição dos níveis de glicose no sangue e aumento da sinalização adrenérgica. Por outro lado, Interleucina 6 (IL-6), TNF- α e Inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1: do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) agem de forma a induzir a síntese de adipócitos com alterações funcionais, resultado de uma desregulação metabólica por conta de supernutrição e um baixo gasto calórico (Clément; Ferré, 2003; Ghaben; Scherer, 2019).

O desbalanço entre a ingestão e o gasto de calorias pode promover uma hiperplasia e posterior hipertrofia de adipócitos, resultando em modificações metabólicas e glicêmicas progressivas. O estresse celular mecânico causado pelo contato entre células com expansão de componentes da matriz extra celular e redução da difusão de oxigênio tecidual podem levar a um processo inflamatório local e sistêmico, seguido de um aumento da resistência à insulina e redução da da captação de glicose, resultado do acúmulo excessivo de TAB, o que pode contribuir para um processo clínico de obesidade (Clément; Ferré, 2003; Ghaben; Scherer, 2019).

Tipos de tecido adiposo

Há, classicamente, três tipos de tecido adiposo com funcionalidades diferentes: o tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo bege.

O TAB está envolvido com o armazenamento de energia, secreção de hormônios e citocinas (adipocinas). Sua morfologia deriva de uma única gotícula de gordura no seu citoplasma (unilocular) e baixa quantidade de mitocôndrias em comparação ao TAM (Tacani *et al.*, 2006). Se divide em tecido adiposo branco visceral (TABV) e tecido adiposo branco subcutâneo (TABS). O primeiro está localizado na região intra-abdominal e no mediastino, enquanto o segundo se localiza na hipoderme (Wronska; Kmiec, 2012).

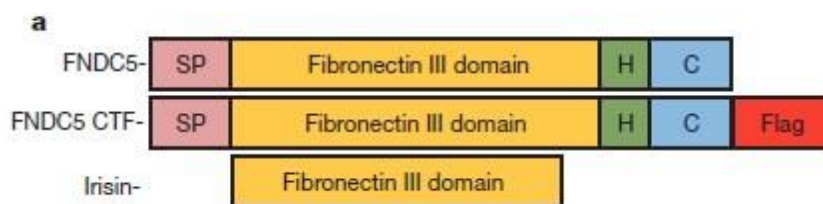
O TAM possui diversas gotas de lipídios dispersas no citoplasma (multilocular), além de uma grande quantidade de mitocôndrias. Possui, na membrana interna das mitocôndrias, a proteína desacopladora UCP 1, que é capaz de carrear os prótons do espaço intermembranas da organela, reduzindo a síntese de ATP e favorecendo a liberação de energia em forma de calor por oxidação de metabólitos, como os ácidos graxos e carboidratos (Tacani et al., 2006).

Já o tecido adiposo bege é resultante da exposição do tecido adiposo branco a situações de frio e/ou aumento de estimuladores β -adrenérgicos, gerando um escurecimento na cor deste (Spiegelman, 2013). Possui características também encontradas no TAM, tais como, formato multilocular, altos níveis de UCP-1 e presença de mitocôndrias, que o distingue do tecido adiposo branco clássico. O processo de escurecimento do TAB está relacionado com o aumento da tolerância a glicose e redução dos níveis de insulina em estados de jejum (Khandekar et al., 2013). Também é capaz de estimular ações lipolíticas, redução da síntese de pré-adipócitos e aumento da expressão da proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP-1: do inglês *uncoupling protein 1*) (Mazur-Bialy, Agnieszka Irena, 2017).

Irisina

Em 2012, foi descrita uma proteína secretada pelos músculos, estimulada por atividade física e situações de frio extremo, denominada proteína 5 contendo domínio de fibronectina tipo III (FNDC5: do inglês *Fibronectin type III domain-containing protein 5*), (Figura 2), com 209 resíduos de aminoácidos, sendo 29 da cadeia N-terminal, 94 do domínio da fibronectina III, uma região não identificada com 28 aminoácidos, um domínio transmembranar com 19, e um C-terminal com 39. A irisina, obtida da proteólise de FNDC5, tem prováveis 112 aminoácidos em sua constituição.

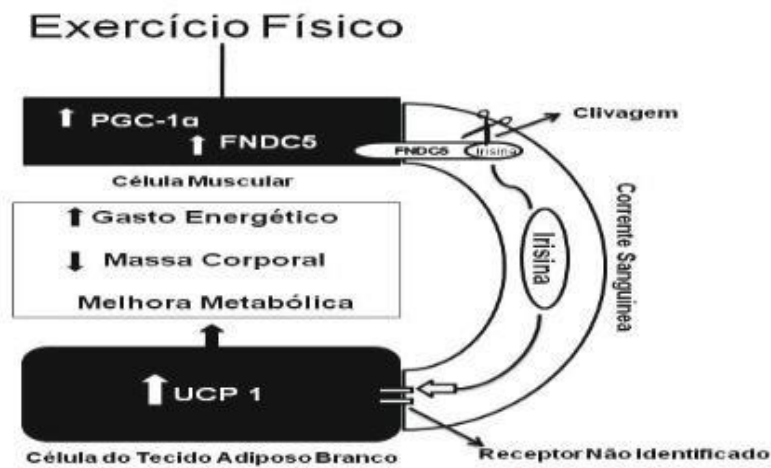
Figura 2 - Estrutura da irisina formada pela proteólise de FNDC5



Fonte: Bostrom et al, 2012; Nature 481(7382): 463-468.

Visto que possui diferentes efeitos biológicos já descritos, como redução da resistência a insulina e desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2, (Moreno-Navarrete et al., 2013), proteção e reparo cardiovascular, melhora da função neuronal, aumento da captação de glicose, além de um papel na ativação de moléculas do sistema imune (Mazur-Bialy, 2017) (Figura 3).

Figura 3 - Indução da liberação de irisinia via proteólise de FND5 estimulada pelo exercício físico seguido de aumento de UCP-1



Fonte: Bonfante et al., 2015; Arq. Ciênc. Saúde 22 (2): 9-15.

Os receptores específicos para atuação da mesma continuam sendo estudados. Recentemente foi descrito que o receptor de integrina $\alpha V-\beta 5$ pode estar envolvido na proliferação e diferenciação de osteócitos e adipócitos quando há a proteólise de FNDC5 via proteínas quinases que induzem mitogênese (MAPK: do inglês *Mitogen-activated protein kinase*), estimulando a fosforilação de P38 MAPK e MAPK/ERK.

Além disso, a ativação do coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PGC1 α : do inglês *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*), estimula um aumento da expressão de UCP-1 podendo conduzir a termogênese e ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK: do inglês *Adenosine monophosphate activated protein kinase*), contribuindo para atenuação de uma resposta pró inflamatória (Arhire; Mihalache; Covasa, 2019; Rabiee et al., 2020; Zhou et al., 2019).

Além dos seus efeitos no tecido adiposo, a irisinia também está relacionada com a função do sistema imune, mais precisamente dos macrófagos, estimulando sua proliferação e aumento

da atividade fagocitária (sem gerar citotoxicidade), mantendo assim a viabilidade celular, redução da produção de moléculas pró inflamatórias (como TNF- α e LPS) e elevação dos níveis de moléculas antioxidantes](como SOD 1 e 2, CAT 9 e GSH Px) (Korta; Poche, 2019; Mazur-Bialy, a. i. *et al.*, 2018).

Macrófagos

Classificação

Os macrófagos são células heterogêneas mieloides do sistema imune (Biswas; Mantovani, 2010) com função fagocítica, envolvidos tanto na imunidade inata quanto adaptativa. São advindos de monócitos circulantes que, ao chegarem aos tecidos alvo, adquirem nomenclaturas características. A defesa do hospedeiro contra microrganismos e a fagocitose de células mortas após um processo inflamatório são algumas das principais funções dos macrófagos (Abu k. Abbas; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai 2012). Outra importante característica dessas células é a capacidade de serem moduladas em resposta a sinalizações de infecção e ativação de outras células, promovendo sua polarização. Em específico há duas formas gerais de polarização dos macrófagos, a responsável por produção de citocinas pró inflamatórias, denominada macrófago classicamente ativado (M1) e macrófago alternativamente ativado (M2), que libera citocinas anti-inflamatórias (Biswas; Mantovani, 2010).

Na obesidade é possível observar o aumento dos níveis dos macrófagos classicamente ativados (M1) e uma ação predominante pró inflamatória no tecido adiposo branco, onde as citocinas secretadas contribuem para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Liu et al., 2014). Por outro lado, a elevada expressão dos macrófagos alternativamente ativado (M2) ocorre em condições não patológicas no TA (Shimobayashi et al., 2018).

As desordens metabólicas estão relacionadas a presença de M1 como tentativa de resolução de um processo pró inflamatório. Quando este processo se torna crônico pode resultar na permanência de macrófagos M1 no tecido, aumentando excessivamente quantidade de citocinas produzidas por M1 e reduzindo as produzidas por M2 (Jablonski *et al.*, 2015).

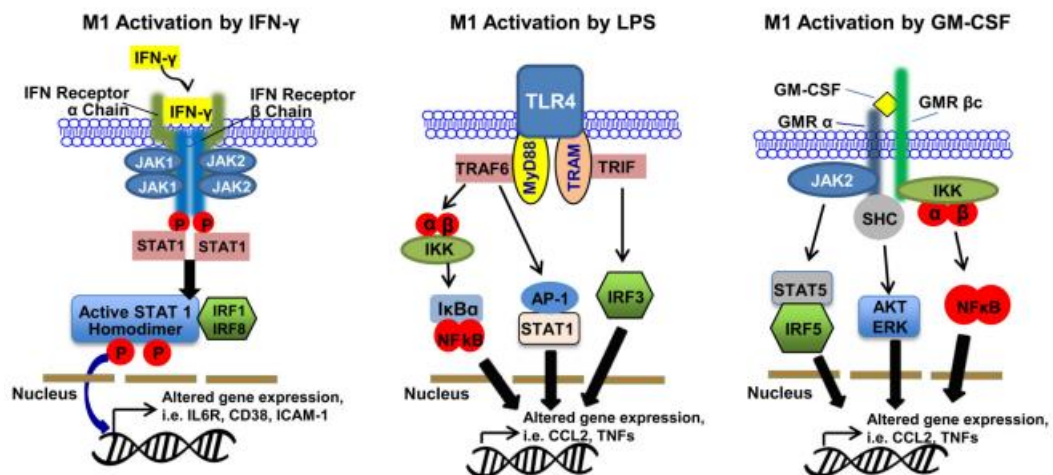
Estudos recorrentes demonstram que a irisina está envolvida com a ação de macrófagos correlacionado a prática de exercício físico e seus benefícios em diversos órgãos (Zhou *et al.*, 2019).

Macrófago M1

Moléculas bacterianas, como o LPS, e o interferon gama (IFN- γ : do inglês *gamma interferon*), secretado por células Th1, induzem a ativação de fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras no macrófago, como o factor nuclear kappa B (NF- κ B: do inglês *nuclear factor Kappa B*), ativador de proteína 1 (AP1: do inglês *Activator protein 1*), fator regulador de interferon (IRF-3 do inglês *Interferon regulatory factor*) e STAT-1, resultando na polarização do macrófago com perfil M1 (Biswas; Mantovani, 2010).

A polarização em macrófago M1 pode ser caracterizada pela produção de moléculas pró inflamatórias como TNF- α , interleucinas 6 (IL-6), 12 (IL-12) e 23 (IL-23), óxido nítrico (NO: do inglês *nitric oxide*) e fator de necrose tumoral (TNF), (Biswas; Mantovani, 2010; Kawanishi *et al.*, 2010). Há também fatores de crescimento que podem influenciar na indução de M1, como o fator estimulante de colônias de granulocitos e macrófagos (GM-CSF: do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Murray, Peter j *et al.*, 2015), (Figura 5).

Figura 4 - Polarização por diferentes estímulos moleculares do macrófago M1



Durante um processo infeccioso estes macrófagos expressam moléculas características, como, a interleucina 12 (IL-12), ligante de quimiocina 9 (CXCL9; do inglês *motif chemokine ligand 9*) e CXCL10 que irão sinalizar linfócitos T helper (Th1) para que a resposta contra ao agente causador do processo inflamatório seja mais eficiente, impedindo a proliferação do dano (Biswas; Mantovani, 2010).

Macrófago M2

O macrófago alternativamente ativado (M2) está envolvido principalmente com encapsulação de parasitos, remodelação do tecido e imunoregulação (Biswas; Mantovani, 2010). Sua polarização é estimulada por interleucina 4 (IL-4), decorrente da resposta de linfócitos T helper 2 (Th2), o que ocasiona ativação da via de sinalização de STAT6 por aumento de fatores de transcrição como, PPAR- γ e fator regulatório de interferon induzido por IL-4 (IRF-4, do inglês *interleukin-4 induced interferon regulatory fator*) (Biswas; Mantovani, 2010), culminando na produção de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) (Shimobayashi et al., 2018) e da enzima Arg1 (Arginase 1) (Liu et al., 2014) (figura 6).

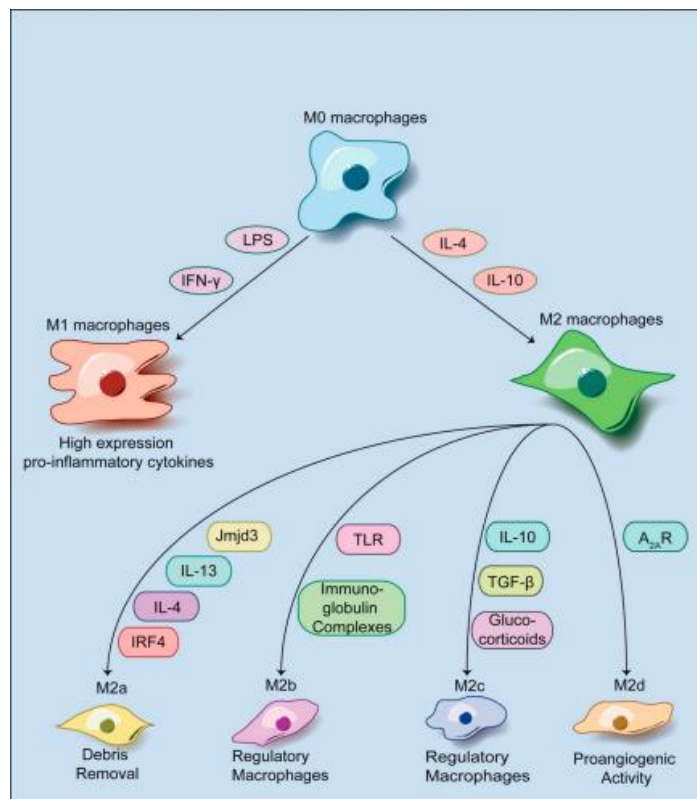
É possível notar que diferentes mecanismos da via de L-arginina conduzem a polarização de macrófagos M1 e M2, visto que, a L-arginina age como substrato do óxido nítrico sintase induzível (NOS: do inglês *nitric oxide synthase*), produzindo NO, ou via arginase para produzir ornitina e uma resposta TH2. Porém, alguns estudos mostram que Arg-1 também é capaz de induzir o perfil M1 em infecções causadas por bactérias, o que é possível notar quando se utiliza o marcador LPS, parecendo haver uma competição pelo substrato L-arginina entre Arg-1 e NOS. Contudo, a literatura mostra que esse processo pode sugerir diminuição da produção de NO quando Arg-1 esta em maior expressão (Kasmi *et al.*, 2009; Murray, Peter J *et al.*, 2015; Sonoki *et al.*, 1997).

Os macrófagos M2 também secretam fatores de crescimento necessários quando em um processo de remodelamento tecidual pós lesão celular, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento endotelial vascular C (VEGFC, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor C*) e fator de crescimento

epidermal (EGF; do inglês *Epidermal growth factor*), envolvidos na angiogênese (Biswas; Mantovani, 2010).

É importante ressaltar que há subclassificações dos macrófagos M2, em M2a, M2b, M2c e M2d. Dentre estes, distintas moléculas são responsáveis pela polarização de cada. Porém, a função anti inflamatória se mantém para todas as subclassificações, principalmente com a expressão de moléculas como IL10, IL4 e receptor de lectina do tipo C (CD206: do inglês *C-type lectin receptor*) (Wang *et al.*, 2019).

Figura 5 - Polarização do macrófago M1 e M2 e suas subclassificações



Fonte: Wang et al, 2019. *International immunopharmacology*; 70 (2019): 459-466.

Na perda de peso corpóreo à longo prazo é observado o aumento de macrófagos M2 no tecido adiposo, demonstrando a importância destas células nas funções relacionadas a lipólise e homeostase tecidual, por meio da diminuição do processo inflamatório (Liu et al., 2014).

Além disso, em ambientes hipotérmicos, estes macrófagos são capazes de promover a secreção de catecolaminas, que tem como finalidade a indução de moléculas termogênicas, como PGC1- α e UCP-1 no tecido adiposo marrom e a lipólise no tecido adiposo branco, resultando na manutenção do estado fisiológico (Liu et al., 2014).

Papel da irisina na polarização de macrófagos

A indução da proliferação e atividade fagocítica de macrófagos é modulada pela presença de diferentes concentrações de irisina o que leva a redução dos níveis de ROS sem alteração na viabilidade celular em linhagem de monócito e macrófagos de camundongos RAW 264.7 (Mazur-Bialy, Agnieszka Irena, 2017).

Recentes estudos observaram que a irisina foi capaz de reduzir expressão de moléculas como Nf-kB, TNF- α e IL-6 nos adipócitos, e ainda, a mudança do perfil M1 para M2. Isto ocorre juntamente ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes, SOD e CAT (Askari *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2016).

A irisina promove aumento de UCP-1 e biogênese mitocondrial, junto a superexpressão de PGC1 α e PPAR- γ no TAB (BARGUT *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2018), fundamentais na formação do TA bege. A irisina é capaz de estimular PPAR- γ , sugerindo um possível efeito na polarização de macrófagos em M2, uma vez que esta é altamente regulada a níveis transcricionais, com a ativação de PPAR- γ e STAT6 no tecido adiposo.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da irisina na polarização de macrófagos em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

1.2. Objetivos específicos

- Avaliar, *in vitro*, o papel da irisina na polarização de macrófagos através da fenotipagem celular

- Expressão e secreção de diferentes moléculas, tais como, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, arginase-1, viabilidade celular e atividade fagocítica.

- Avaliar a influência da obesidade na polarização de macrófagos, considerando o papel da irisina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento e implantação de um modelo de obesidade com dieta hiper-lipídica em camundongos c57bl/6

Para este trabalho foram utilizados camundongos machos C57BL/6, recém desmamados (29 dias após nascimento). Os camundongos foram divididos em dois grupos: dieta com ração controle e dieta hiperlipídica (Quadros 1 e 2).

Os animais passaram por um monitoramento durante 30 semanas, tendo o peso corpóreo, assim como a quantidade de ração ingerida medidos semanalmente.

Tabela 3 - Componentes das dietas controle e hiperlipídica utilizadas para modelo murino em gramas (g).

	Farelo Padrão	Mix Mineral	Mix Vitamínico	Leite Condensado	Gordura Vegetal
Hiperlipídica	600g/kg	7g/kg	2g/kg	150g/kg	250g/kg
Controle	-	-	-	-	-

Fonte: A Autora, 2021.

Tabela 4 Composição calórica das dietas controle e hiperlipídica para modelo murino.

	Lipídio	Proteína	Carboidrato	Total Kcal/Kg
Hiperlipídica	62%	10%	28%	4.412
Controle	23%	22%	55%	3.000

Fonte: A Autora, 2021.

2.2. Obtenção do meio de diferenciação lcm (meio condicionado de I-929)

As células de origem fibroblástica L929 foram mantidas em cultura (5% CO₂ a 37°C) em frasco médio (75 cm²; Corning®) até atingir a confluência. Quando confluyente, todo o conteúdo da garrafa foi passado para uma garrafa grande (150 cm²) com 25 ml de meio essencial modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco Invitrogen Corporation®, New Jersey, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Ao atingir a confluência, o meio foi trocado por 50 ml de DMEM + 10% FBS. Após 7 dias de cultivo, o sobrenadante celular foi coletado, filtrado em membrana de polietersulfona 0,2 µM (GVS® Filter Technology, Morecambe, UK) e armazenado em freezer a -80°C até o uso.

2.3. Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Após 30 semanas com dieta C ou HL, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e tiveram suas patas removidas para isolamento do fêmur e tíbia. Em um ambiente estéril, a pele e os músculos ao redor dos ossos foram removidos com a ajuda de uma pinça. Os ossos foram lavados em PBS estéril, inseridos em tubos cônicos de poliestireno e centrifugados a 400 x g por 5 minutos para remover as células da medula óssea. As células foram então ressuspensas e cultivadas em meio DMEM contendo 15% de LCM (meio de diferenciação). Todos os materiais cirúrgicos foram esterilizados.

As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 7 dias para diferenciação dos macrófagos, quando foram retiradas dos frascos, plaqueadas em placas de 96 ou 24 poços e deixadas em incubadora de CO₂ por 90 min para adesão.

Para os ensaios de produção de MTT, fagocitose e ROS, os BMDM foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^5 células por poço. Para citometria de fluxo e produção de nitrito, os BMDM foram semeados em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^6 células por poço.

2.4. Polarização dos macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Para a polarização BMDM, metade do meio de diferenciação foi removido e substituído por meio de polarização específico. Para a diferenciação M1, os BMDM foram estimulados com LPS (1 µg / ml) e IFN-γ (1000 ng / ml) por 72 horas (grupo LPS+IFN-γ). Para diferenciação de M2, os BMDM foram estimulados com IL-4 (20 ng / ml) por 72 horas (grupo IL-4).

Para o tratamento com irisina, os BMDM foram mantidos por 48 h com meio DMEM contendo 15% de LCM. Em seguida, metade do meio de diferenciação foi removida e substituída por DMEM suplementado com 10% de SFB e 20 nM (grupo IRI20) ou 50 nM (grupo IRI50) de irisina pelas próximas 24 horas. Trocado 10% de irisina e meio sem a mesma. Macrófagos sem qualquer estimulação foram usados como controle (M0). Após o período de polarização ou tratamento com irisina, diferentes ensaios foram realizados.

2.5. Citometria de fluxo

Para análise de marcadores de superfície, os BMDMs (1×10^6 células por poço) obtidos de camundongos do grupo controle e hiperlipídico foram polarizados com estímulo IFN γ + LPS e IL-4, seguido do cultivo na ausência ou presença da irisina (20 nM e 50 nM) por 48 h. Após esse período o sobrenadante foi coletado, as células retiradas da placa com ajuda mecânica e ressuspensos em tampão para citometria de fluxo contendo 2% de soro bovino de albumina, 5% SFB e 0,1% sódio azidico, para bloqueio de marcação inespecífica. Após 30 minutos, as células foram incubadas com anticorpos anti-F4/80-APC (1:50) e anti-CD206-PE (1:50) e anti CD301-PE (1:50) por 30 minutos ao abrigo de luz, para posterior análise pelo citometro (BD ACCURI™ C6). Para controle de marcações inespecíficas as células foram incubadas com os respectivos isótopos controle. Foram consideradas células positivas para F4/80, CD206 e CD301 apenas as células não marcadas com respectivo isótopo controle. Os isotipos foram utilizados para controle do experimento.

2.6. Quantificação de proteínas BMDM

As células foram retiradas de placas de 24 poços com um raspador de células em 300 µl de tampão RIPA, respectivamente [1M Tris-HCl (pH 7,4); NaCl 1M; 0,5M Na₄P₂O₇; NaVO₃ 0,5M; PMSF 200 mM; 1% SDS; inibidor de protease (PI 11836170001; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]. A suspensão de células foi então centrifugada a 3000 x g durante 10 minutos a 4 ° C. O conteúdo de proteína total foi determinado pelo Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, Rockford, IL, EUA).

2.7. Ensaio de imunoblotting e expressão de arginase-1

50 µg de proteína foram submetidos a eletroforese (10% SDS-PAGE) e transferidos para membranas de PVDF que foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado e sondadas com anticorpo monoclonal de anti-arginase-1 de camundongo (1:1000, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) ou anticorpo monoclonal anti-beta-actina de camundongo (1: 10000; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) durante a noite a 4 ° C. Após extensas lavagens em TBS-Tween, membranas de PVDF foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de *horseradish* na concentração 1:10.000 e desenvolvidas com sistema ECL. Proteínas imunorreativas foram visualizadas usando o sistema ECL (BIO-RAD, Califórnia, EUA) no sistema de aquisição de imagem ChemiDoc XRS + (BIO-RAD, Califórnia, EUA).

2.8. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Um ensaio de MTT modificado [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] foi usado para quantificar o efeito da Irisina na sobrevivência dos macrófagos. Este método mede a função mitocondrial conforme descrito anteriormente (Varin *et al.*, 2010). Macrófagos (2 × 10⁵ células / poço) obtidos de camundongos controle e hiperlipídico e polarizados com estímulo

de IFN γ + LPS e IL-4 foram incubados na ausência ou presença de irisina (20 nM e 50 nM) por 48 h. Após esse período o sobrenadante da cultura celular foi removido e as células lavadas com PBS (200 μ l). Cada poço teve a adição de 50 mg de MTT diluído em PBS. Após 4 h de incubação a 37 ° C ao abrigo de luz, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados por redução de MTT foram solubilizados em álcool isopropílico por 30 minutos a 37 ° C. A leitura da absorbância foi feita no leitor ENVISION® (540nm) e representada como valor arbitrário.

2.9. Fagocitose

A capacidade fagocítica de BMDM foi analisada conforme descrita anteriormente (Van Pham et al., 2014). Macrófagos (2×10^5 células / poço) obtidos de camundongos do grupo controle e hiperlipídico foram polarizados com estímulo IFN γ + LPS e IL-4, seguido do cultivo na ausência ou presença da irisina (20 nM e 50 nM) por 48 h a 37°C. O sobrenadante da cultura foi removido e as células incubadas com Dextran conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1mg/mL, Sigma Aldrich). Após 2 h, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS. Após 2 lavagens, PBS foi adicionado à placa e a fagocitose foi analisada no leitor ENVISION®. Células incubadas na ausência de Dextran-FITC foram usadas como controle negativo do experimento. As células positivas para Dextran-FITC foram consideradas como células que engolfaram Dextran-FITC com sucesso. Os resultados são expressos como valores de absorbância (525nm).

2.10. Espécie reativa de oxigênio (ROS)

A geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos foi avaliada por estudos de imunofluorescência monitorando a oxidação de Dihidrorodamina (DHR) em rodamina por H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), conforme descrito anteriormente (Mazur-bialy, a. i. *et al.*, 2018). BMDM (2×10^5 células/poço) obtidos de camundongos controle e HL polarizados para fenótipos M1 e M2, conforme descrito anteriormente, foram semeados em placas de 96 poços e tratados ou não com Irisina (20 e 50nM) por 24 hs na presença de DHR (concentração final 50 μ M). BMDM não estimulados foram usados como controle. Após incubação, a produção de

ERO por essas células foi avaliada através de microscópio de fluorescência (Olympus) e a quantificação da fluorescência foi realizada usando o software IMAGE J.

2.11. Oxido nítrico

A produção de nitrito foi determinada pelo acúmulo de um produto de nitrito estável em sobrenadantes de cultura sem células usando um método de reação de Griess modificado (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico, 0,1% de N-(1-naftil)etilenodiamina), na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração intensa (Green *et al.*, 1981). BMDMs obtidos de camundongos controle e HF e polarizados para fenótipo M1 e M2, conforme descrito anteriormente, foram cultivados na ausência ou presença de Irisina (20 e 50nM) por 8h à 37 ° C. BMDM não estimulados foram usados como controle. Após esse período o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos para retirada das células. Em placa de 96 poços, 100 µL do Reagente de Griess foi adicionado a 100 µL do sobrenadante à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi quantificada em um leitor de placas ENVISION® (absorbância a 346 nm). Concentrações conhecidas de Nitrito de Sódio foram usadas como curva padrão.

2.12. Análise estatística

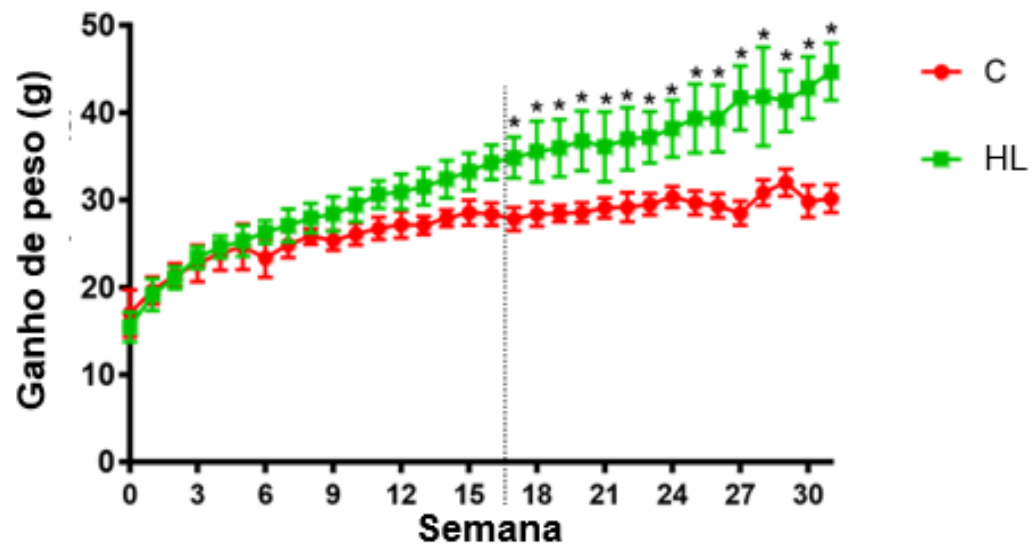
Para a análise estatística foi utilizado o GraphPad Prism 5.0. Todos os dados são apresentados como média \pm SD. A análise de variância unidirecional (One-way ANOVA) seguida pela análise post hoc de Tukey foi utilizada para comparações dentro do mesmo grupo. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Ganho de peso e eficiência alimentar

Observamos um aumento do ganho de peso dos animais do grupo HL em relação ao grupo controle em 43%, a partir da 17ª semana até a 30ª semana (figura 6). Tanto o tempo quanto a dieta são fatores determinantes para a variação de peso observada ($p < 0,0001$).

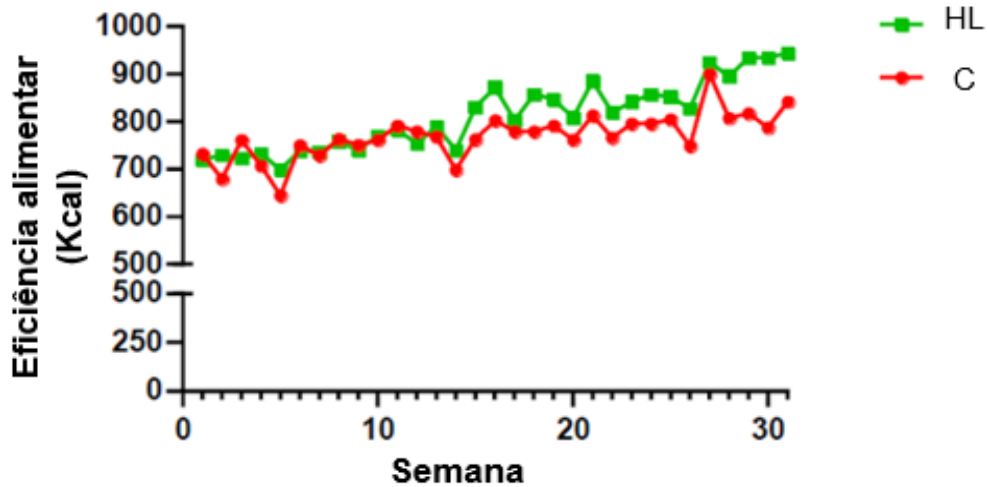
Figura 6 - Peso corpóreo dos animais do grupo controle (n=6) e submetidos a dieta hiperlipídica (n=6) durante 30 semanas de tratamento



Fonte: A Autora, 2021.

Na figura 7, observamos a eficiência alimentar ao longo do período, em kcal.

Figura 7 - Eficiência alimentar durante 30 semanas de tratamento, em Kcal, dos animais do grupo controle (n=6) e submetidos a dieta hiperlipídica (n=6)



Fonte: A Autora, 2021.

Apesar de não haver diferença significativa no consumo calórico entre os grupos, o grupo HL teve sua massa corporal mais elevada que o grupo controle, sugerindo que este fator se deve à qualidade da dieta ingerida, com maior composição lipídica.

3.2. Citometria de fluxo

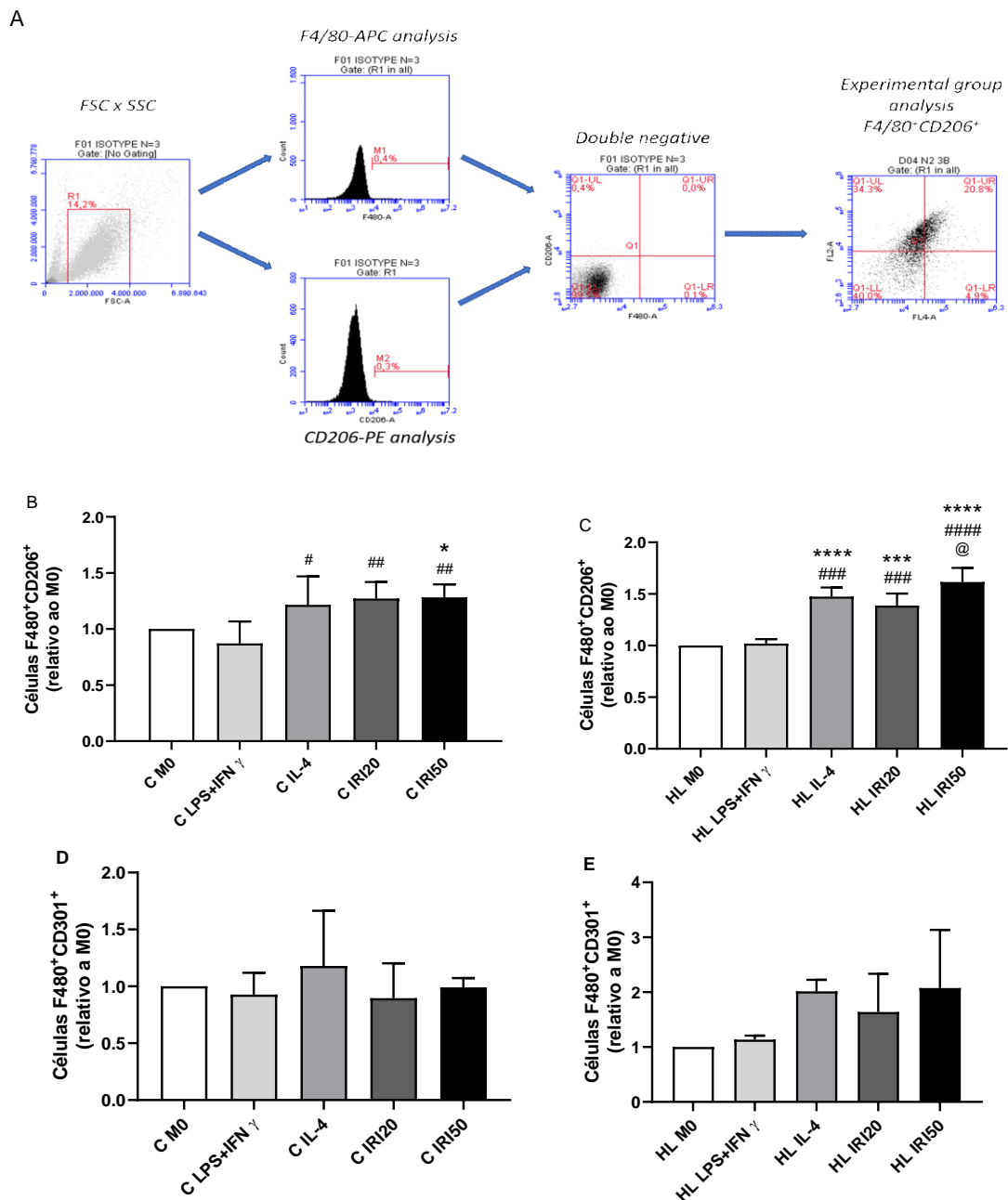
Na figura 9 podemos observar que nos animais controle há mais células F4-80⁺CD206⁺ nos macrófagos tratados com irisina 50nM em relação ao grupo M0 e nos macrófagos tratados com irisina 20 e 50 nM em relação ao grupo LPS+IFN- γ (Figura 8B).

Já nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, há mais células F4-80⁺CD206⁺ nos macrófagos tratados com IL-4, irisina 20 mM e irisina 50nM em relação aos grupos M0 e LPS+IFN- γ (Figura 8C).

Este resultado mostra que, nos animais HL, o tratamento com IL-4 foi capaz de estimular a expressão de CD206, característica de macrófagos M2, e que o tratamento com LPS+IFN- γ não influenciou a mesma. Em relação ao tratamento com irisina, observamos que as duas doses utilizadas foram capazes de conduzir a um perfil semelhante ao induzido por IL-4, sugerindo que esta citocina estimula a polarização de M0 em M2. Ainda, a quantidade de

células F480⁺CD206⁺ foi maior após o tratamento com 50 nM de irisina em relação ao tratamento com 20 nM de irisina, sugerindo um efeito dose dependente.

Figura 8 - Gating realizado na citometria de fluxo



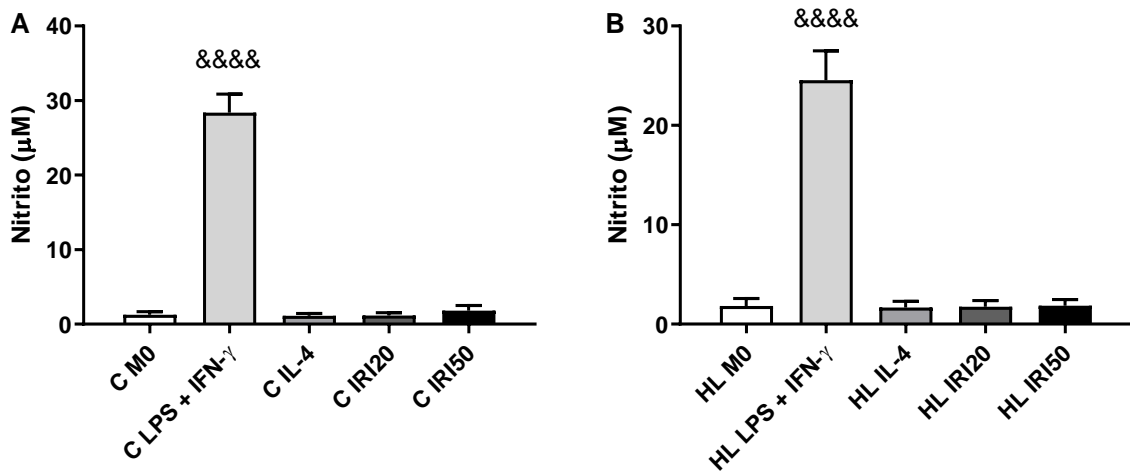
Nota: Exemplo mostrando o gating realizado na citometria de fluxo para dupla marcação para F480⁺ e CD206⁺ para caracterização do fenótipo dos macrófagos(A). Dupla marcação F4/80⁺ CD206⁺ em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (B) e HL (C), mostrando a indução da expressão de CD206 por IL-4 e irisina 20 nM e 50 nM. Dupla marcação de F4/80⁺ CD301⁺ em macrófagos dos grupos C (D) e HL (E). * Difere do M0 (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$), # Difere do LPS+IFN- γ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$) e @ Difere do IRI20 (@ $p < 0,05$).

Fonte: A Autora, 2021.

3.3. Ensaio espécie reativa de nitrito

Na figura 9 podemos observar que a produção de nitrito pelos macrófagos do grupo C LPS+IFN- γ e HL LPS+IFN- γ está aumentada em relação a todos os demais grupos. As estimulações com IL-4 ou com irisina 20 ou 50 mM não foram capazes de modular a produção de nitrito.

Figura 9 - Ensaio de espécie Reativa de Nitrogênio (Nitrito) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM. &&&& Difere de todos os demais grupos ($p < 0,0001$)

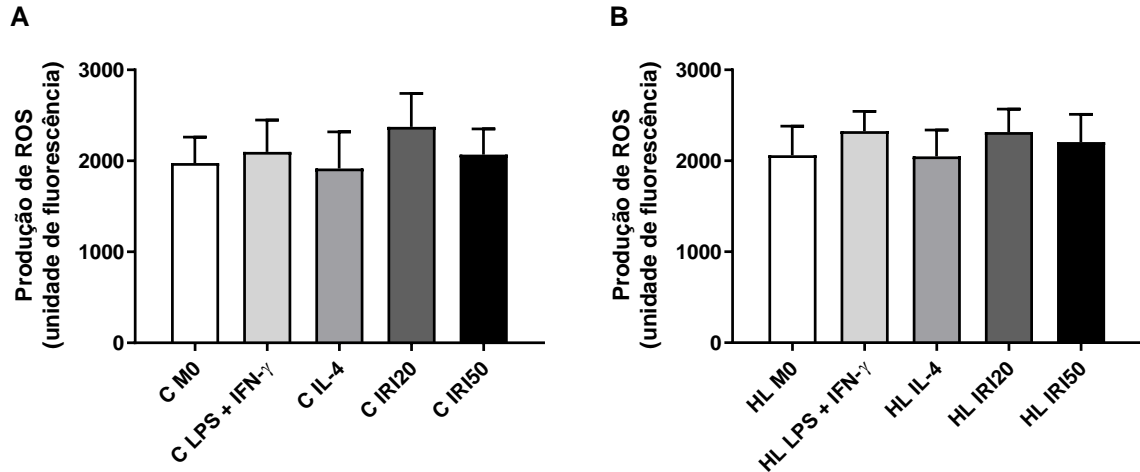


Fonte: A Autora, 2021.

3.4. Ensaio de espécie reativa de oxigênio (ROS)

Na figura 10 está representada a produção de ROS pelos macrófagos sob os diferentes estímulos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais tanto nos animais controle quanto nos animais com dieta hiperlipídica.

Figura 10 - Ensaio de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.

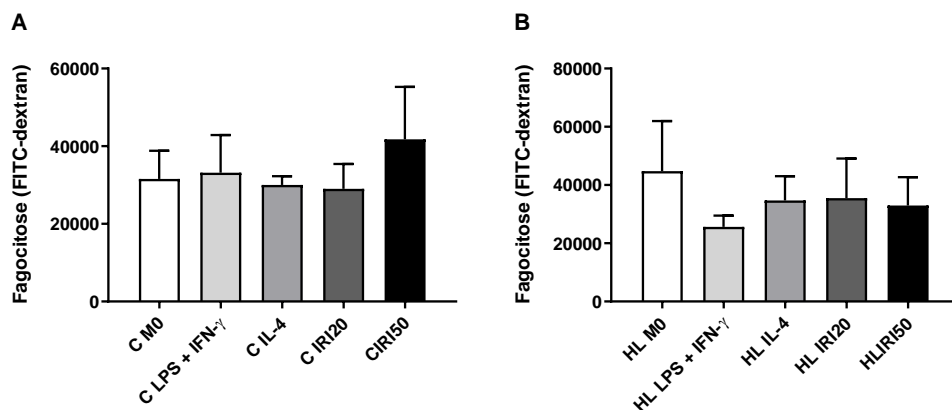


Fonte: A Autora, 2021.

3.5. Ensaio de fagocitose

Na figura 11 observamos a capacidade de fagocitose dos macrófagos sob os diferentes estímulos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais tanto nos animais controle quanto nos animais com dieta hiperlipídica.

Figura 11 - Ensaio para fagocitose em células em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.

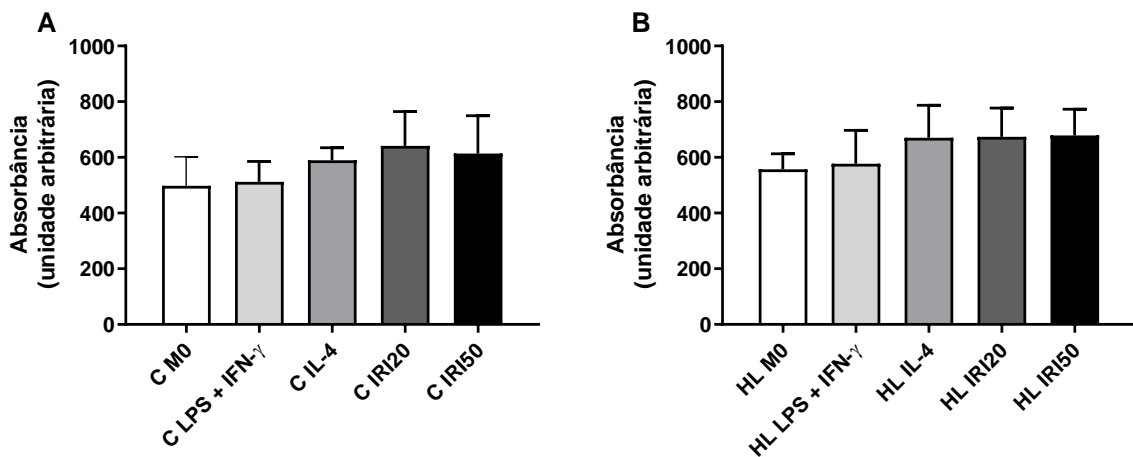


Fonte: A Autora, 2021.

3.6. Viabilidade celular (MTT)

Na figura 12, podemos observar a viabilidade dos macrófagos dos grupos C e HL submetidos a diferentes estímulos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais tanto nos animais controle quanto nos animais com dieta hiperlipídica.

Figura 12 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C (A) e HL (B), após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM.



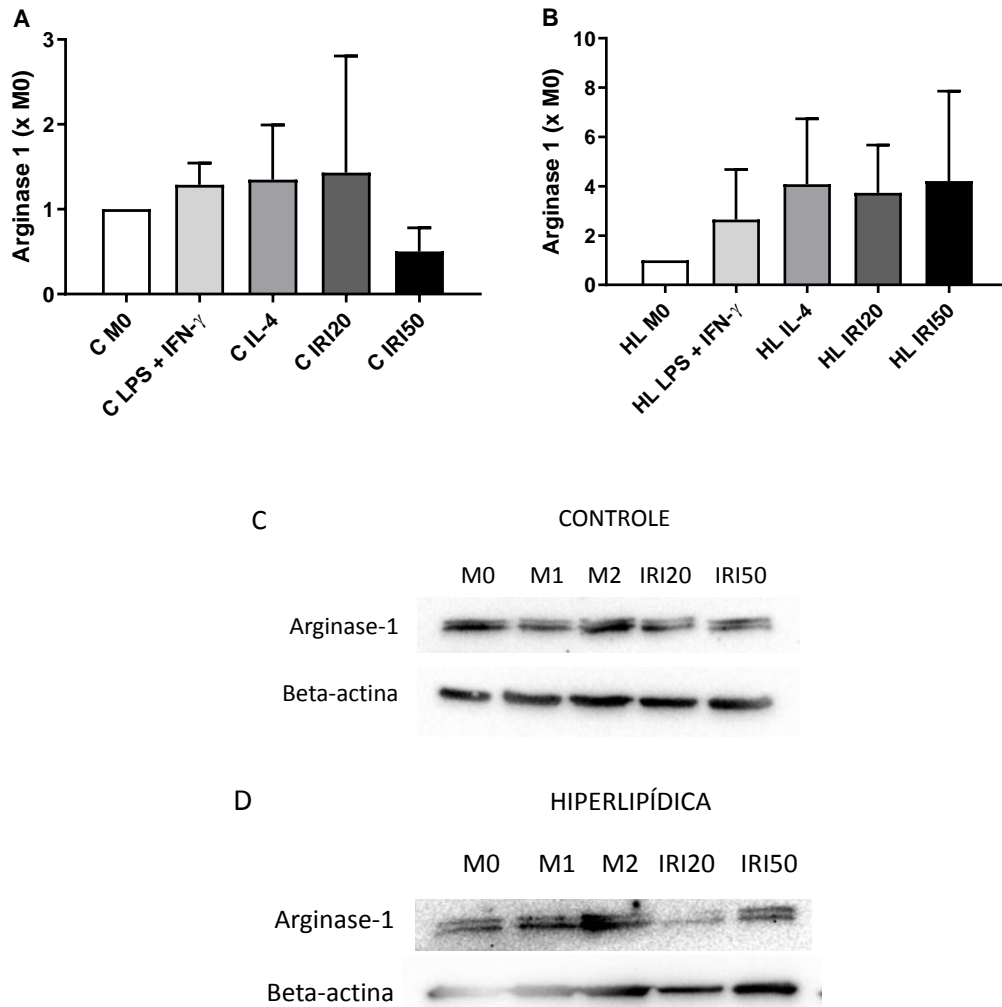
Fonte: A Autora, 2021.

3.7. Resultado preliminar da expressão de arginase -1

Podemos observar que não houve aumento na expressão de arginase - 1 no grupo de macrófagos tanto do grupo controle quanto do grupo com dieta hiperlipídica, independente do estímulo recebido (Figura 13).

É importante ressaltar que pode ser observada uma modulação da expressão do controle interno (beta-actina) no grupo HL. Por este motivo, outro controle interno deve ser utilizado para conclusão final a respeito da expressão de Arg-1.

Figura 13 - Expressão de arginase-1 em macrófagos derivados de medula óssea dos grupos C e HL



Nota: Após estímulo com LPS+IFN- γ , IL 4, irisina 20 nM ou irisina 50 nM. Em (A), representação gráfica da relação entre os valores da análise densitométrica de arginase-1 e beta-actina do grupo HL. Em (C), fotografia representativa da exposição da membrana contendo os grupos derivados de animais controle, mostrando a densitometria para arginase-1 e beta-actina. Em (D), fotografia representativa da exposição da membrana contendo os grupos derivados de animais com dieta hiperlipídica, mostrando a densitometria para arginase-1 e beta-actina.

Fonte: A Autora, 2021.

4. DISCUSSÃO

A obesidade e o sobrepeso são fatores relacionados ao desenvolvimento de doenças como diabetes, alterações cardiovasculares, e até mesmo câncer. Apesar de ser uma alteração característica de países desenvolvidos, já se observa um aumento significativo na taxa de indivíduos com tal condição em países de baixa e média renda (Who, 2018).

Observamos, em indivíduos com obesidade, uma inflamação crônica sistêmica, com aumento da população de macrófagos inflamatórios no tecido adiposo (Arhire; Mihalache; Covasa, 2019). Como a irisina parece desenvolver um papel na redução da expressão de NF- κ B, um fator de transcrição altamente associado com a expressão de diversas moléculas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e STAT1 (Funes; Rios; Escobar-Vera, 2018; Kasmi *et al.*, 2009; Starr, 2011), podemos sugerir que ela pode auxiliar na redução da inflamação sistêmica observada na obesidade.

O estímulo de irisina via AMPK regula a sinalização lipolítica e aumenta a oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e diminui a glicogênese (Xin *et al.*, 2015; Zhang; Zhou; Li, 2009). Seu papel no metabolismo também pode ser observado através de sua ação no tecido adiposo branco, estimulando o processo de escurecimento do mesmo e contribuindo para a diminuição da resistência à insulina por meio do auxílio no transporte de glicose para tecidos como músculos, resultando em níveis diminuídos de glicose no sangue. Além disso, influencia o processo de regeneração tecidual e proliferação celular (Ling *et al.*, 2017). Todos estes fatores ressaltam a importância do estudo desta miocina no controle da progressão e no tratamento da obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e resistência a insulina.

Em nosso modelo animal, o consumo em gramas dos animais controle foi maior em relação ao grupo hiperlipídico, porém a quantidade em Kcal foi similar em ambos como consequência da densidade energética da ração hiperlipídica que é maior.

No entanto, foi observado um ganho de peso dos animais que receberam dieta hiperlipídica em relação ao grupo controle ao longo de 30 semanas, mais precisamente, a partir da 17ª semana da dieta, provavelmente devido ao alto teor de lipídios e depressão nutricional da dieta (White *et al.*, 2013). Ao final do período experimental, os animais do grupo HL obtiveram um aumento de peso corpóreo de aproximadamente 43% em relação ao grupo C. É importante ressaltar que, apesar de hipoproteica, a dieta hiperlipídica utilizada pelo nosso grupo é bem aceita na literatura quando o objetivo final é promover aumento da adiposidade em

animais experimentais, com perfis metabólicos e patológicos semelhantes aos observados no sobrepeso e obesidade em humanos (Castiglione *et al.*, 2018; Marques Neto *et al.*, 2016; Marques Neto *et al.*, 2020).

Para caracterizar as populações de macrófagos induzidas pelos diferentes estímulos utilizados, avaliamos primeiramente as populações de macrófagos CD206 e CD301 (lectina ligadora de galactose do macrófago) positivas (Dong *et al.*, 2016; Starr, 2011; Zhang, Yingying *et al.*, 2013). Observamos, neste trabalho, um aumento da quantidade de células F480/CD206⁺ tanto nos animais C quanto HL após estímulo com IL-4 e 20 e 50 nM de irisina, o que não ocorreu com LPS+IFN- γ . Ainda, o grupo HL com irisina 50 nM apresentou mais células F480/CD206⁺ do que o grupo HL com irisina 20 nM, sugerindo um efeito dose dependente da irisina. Como o mesmo não ocorreu no grupo C, também sugerimos que este efeito dose dependente pode ser influenciado por outros fatores, como a dieta hiperlipídica.

Por esse motivo, podemos sugerir que o tratamento com irisina estimula um fenótipo nos macrófagos semelhante ao estimulado por IL-4, descrito como M2.

Uma limitação deste trabalho foi a ausência de marcação destas células para uma molécula presente em macrófagos M1, como CD86 (Rutschman *et al.*, 2015; Starr, 2011), que pudesse confirmar nossos achados. No entanto, podemos observar que é aceito na literatura a caracterização de M2 sem exclusão de M1 por marcador específico (Simões *et al.*, 2017). No estudo citado, foi avaliada a influência de M2 em tumores associados a macrófagos junto a atividade de ATL (aspirin-triggered lipoxin), utilizando dois marcadores de superfície para M2 por ensaio de citometria de fluxo, MRC1 (Mannose Receptor C- Type 1) e CD163, em murinos C57/BL6.

O excesso de ganho de peso resulta em atividades pró inflamatórias devido ao baixo teor nutritivo e elevada quantidade de lipídios da dieta, o que pode ocasionar uma alteração funcional celular e expressão de citocinas inflamatórias promovendo uma resposta Th1 e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como tentativa de reparo da injúria tecidual (Funes; Rios; Escobar-Vera, 2018). Associado a isto, há uma alta expressão de iNOS, uma enzima que catalisa a conversão de L-arginina em NO e citrulina, sendo seu principal indutor agonistas de receptor TLR, como LPS e IFN- γ (Kasmi *et al.*, 2009).

No nosso trabalho, não observamos nenhuma modulação em relação à produção de ROS no grupo C ou HL. Contudo, já foi demonstrado na literatura que a produção de ROS está reduzida em macrófagos RAW 264.7 na presença de 50 e 100 nM de irisina (Mazur-Bialy, A. I. *et al.*, 2017; Mazur-Bialy, Agnieszka Irena, 2018). Foi observado também que a polarização

alternativa de macrófagos por IL-4 reduz a geração ROS e a fagocitose de patógenos, embora não tenhamos observado tais efeitos em nosso estudo (Varin *et al.*, 2010; Mazur-bialy, A. I. *et al.*, 2018).

A diferença dos nossos resultados para os resultados encontrados na literatura pode ter diferentes explicações:

1) Tivemos uma limitação técnica no método de imunofluorescência utilizado por nós para quantificar a expressão de ROS, através da oxidação de Diidrorodamina em Rodamina por H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), pois a placa onde foi executada a reação foi de fundo branco e não fundo escuro como sugerido no uso de análises por fluorescência. Este fator pode ter interferido no resultado, apesar de ainda ser considerado um método utilizado para quantificação da expressão de ROS (Ren *et al.*, 2019; Griess *et al.*, 2020;).

2) Utilizamos, em nosso trabalho, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, enquanto os trabalhos na literatura que avaliam a ação da irisina na produção de ROS por macrófagos utiliza a linhagem celular RAW 264.7.

3) Além de ser utilizada uma linhagem celular, os trabalhos encontrados na literatura utilizam também doses maiores de irisina (100nM) do que as utilizadas neste estudo (20 e 50 nM). Apesar de a dose de 50 nM ser utilizada em ambos os casos, a utilização de cultura de células primária, e não uma linhagem celular, pode gerar respostas diferentes a um mesmo estímulo.

Para avaliar a produção de IRN mensuramos a quantidade de nitrito produzida, uma vez que íons de nitrito e nitrato são produtos de quebra estáveis da metabolização da L-arginina e que podem ser facilmente medidos (Padgett; Pruett, 1992). Nossos resultados mostram que, tanto no grupo C quanto HL, o estímulo com LPS+IFN- γ promove aumento da produção de nitrito nos BMDM. O estímulo com IL-4 e com diferentes doses de irisina não produziram o mesmo efeito, mostrando que a irisina tem efeitos semelhantes à IL-4 no que diz respeito a produção de IRN.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que relata menor expressão de NO em BMDM de camundongos deficientes de STAT 6 na presença de IL-4 (Rutschman *et al.*, 2015). Em adição, estudos comparando o efeito da irisina em outros tecidos, como ovários de porcos, foi mostrado que o tratamento de células ovarianas com 100 ng/ml e 150 ng/ml de irisina resultou em baixa expressão de ON (Basini *et al.*, 2021).

Para auxiliar na caracterização do perfil destas populações de macrófagos, realizamos também os ensaios de atividade fagocítica, expressão de arginase 1 e viabilidade celular.

Nossos resultados não demonstraram dados significativos para os grupos C e HL quanto ao ensaio de fagocitose partindo da adsorção de DEXTRAN conjugado ao FITC (isocianato de fluorescina). Contudo, outros estudos puderam observar a redução da atividade fagocítica em BMDMs pré incubados com FNDC4, uma molécula pertencente a mesma família de proteínas contendo domínio de fibronectina do tipo III, como FNDC5. A partir do método por detecção de fluorescência com a utilização de partículas de Zymosan A em adição de 100 nM de FNDC4 houve redução da fagocitose por macrófagos (Bosma *et al.*, 2016).

Junto a isto, a porcentagem de células fagocíticas e a intensidade da atividade da mesma em concentrações de irisina 50 e 100 nM em células RAW 264.7, avaliadas por citometria de fluxo, foi maior do que sem o tratamento com irisina (Mazur-Bialy, Agnieszka Irena, 2017).

Novamente, a diferença dos nossos resultados para os resultados encontrados na literatura pode ser devida a diferentes fatores, como dose da irisina, molécula utilizada para estudo (FNDC4 vs. irisina) e modelo experimental escolhido.

É importante ressaltar que, apesar dos resultados obtidos, a capacidade fagocítica dos macrófagos esta presente tanto em atividade de M1 quanto M2, como já demonstrado na literatura, e que há poucos trabalhos publicados abordando a ação da irisina na fagocitose de macrófagos (Zhang, Michael *et al.*, 2016; Olivera-Perez *et al.*, 2017). Em conjunto, estes fatos mostram a necessidade de mais estudos que abordem a interação de macrófagos com doses diferentes de irisina e ainda, com interveção da dieta hiperlipídica como fator adicional, para avaliar a polarização dos macrófagos sob influência destes fatores.

Surpreendentemente, não observamos um aumento na expressão de arginase-1 em macrófagos do grupo C e HL. Porém, estas análises foram preliminares e deverão ser repetidas para conclusão final deste resultado, uma vez que a expressão do controle interno (beta actina) parece ser modulado pela dieta hiperlipídica e pelos tratamentos utilizados. O próximo passo é utilizar um controle interno diferente, como o reagente de Ponceau, para realizar uma quantificação mais fidedigna da expressão de arginase-1. Adicionalmente à expressão proteica, a literatura mostra métodos para comprovar a atividade da arginase, que poderiam ser inseridos futuramente no nosso estudo, como o ensaio de conversão de arginina em ureia ou ornitina pela arginase (Corraliza *et al.*, 1994).

Na literatura observamos que a expressão de IL-10 e atividade da arginase são estimuladas por IL-4 (Zhang, Yingying *et al.*, 2013) e arginase 1 por irisina em células RAW 264.7 (Ye *et al.*, 2020), mostrando uma relação entre a produção de arginase e atenuação da resposta pró inflamatória pela indução de um fenótipo M2 nos macrófagos (Mantovani, 2012; Mosser, 2017).

Ao observarmos o ensaio para viabilidade celular, não obtivemos resultados significativos, ao contrário do descrito na literatura, com a irisina possivelmente impondo efeito de aumento da viabilidade celular partindo do estímulo com ou sem LPS somado a uma concentração de 50 e 100 nM de irisina em adipócitos diferenciados de células 3T3 L1 (Bilski E. *et al.*, 2017). Em adição, a partir da linhagem de camundongos RAW264.7 na presença de lipoproteína de baixa densidade oxidada, LDL, nas concentrações de irisina (20 ng/ml, 50ng/ml e 80 ng/ml) também foi observado maior taxa de viabilidade celular (Zheng *et al.*, 2018). Tomando em consideração a capacidade de polarização de macrófagos diante de mudanças em um microambiente, não observamos também em HL na presença de 20 e 50 nM de irisina um aumento de viabilidade celular. Cabe ressaltar que os estudos citados foram realizados em linhagem celular, e não com cultura primária, e não tiveram intervenção com dieta hiperlipídica.

Um dado importante a ser observado acerca da segurança da utilização da irisina para polarização de macrófagos é que o tratamento em questão não provocou redução da viabilidade celular indo de acordo com a literatura (Mazur-bialy, A. I. *et al.*, 2018). Contudo, mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão do que de fato ocorre quanto a presença da irisina em grupos previamente estimulados por diferenciação não apenas em macrófagos *naive*, mas após estímulo para diferenciação em M1 e M2 junto a uma dieta hiperlipídica.

Por fim, devemos destacar que o modelo utilizado no presente trabalho, com tratamento de BMDM com irisina em animais submetidos à dieta hiperlipídica, não possui referências prévias na literatura, permitindo comparação de resultados apenas com linhagem celular ou com animais com dieta padrão.

CONCLUSÃO

No modelo experimental utilizado, mostramos que o tratamento com irisina em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos foi capaz de estimular a expressão de CD206 em macrófagos, além de não ser capaz de estimular a produção de óxido nítrico. Apesar das limitações do estudo, podemos sugerir que a irisina estimula a polarização de BMDM de forma semelhante a IL-4, com possível potencial imunomodulador e antiinflamatório na obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7^{ed}. Elsevier, p. 16, 2012.
- ALONSO-VALE, M. I. C. et al. *Controle da adipogênese por ácidos graxos*. São Paulo: Arq Bras Endocrinol Metab., v. 38, n 5, p. 582-94, 2009.
- ARHIRE, L.; MIHALACHE, L.; COVASA, M. *Irisin: a hope in understanding and managing obesity and metabolic syndrome*. [S.I.], *Frontiers in endocrinology*, v. 10, p. 524, 2019.
- ASKARI, H. et al. *A glance at the therapeutic potential of irisin against diseases involving inflammation, oxidative stress, and apoptosis: an introductory*. [S.I.], *Pharmacological research*, v. 129, p. 44–55, 2018.
- BARDI, G. T.; SMITH, M. A.; HOOD, J. L. *Melanoma exosomes promote mixed m1 and m2 macrophage polarization*. *Cytokine*, Louisville, v. 105, p. 63–72, 2018.
- BARGUT, T. C. L. et al. *Browning of white adipose tissue: Lessons from experimental models*. Rio de Janeiro: *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, v. 31, n 1, p. 1-13, 2017.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID M. J. et al. *Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo*. [S.I.], *Química nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm*. [S.I.], *Nature Immunology*, v. 11, n.10, p. 889–896, 2010.
- BOBINSKI, F. et al. *Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain*. [S.I.], v. 159, n. 3, p. 437–450, 2017.
- BONFANTE, I. I. et al. *Novos achados relacionados ao tecido adiposo: uma revisão de literatura sobre o Browning e irisina*. [S.I.], *Arq. ciênc. saúde*, v. 22, n. 2, p. 9-15, 2015.
- BOSSCHE, J. V. D. et al. *Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages*. [S.I.], *Cell reports* v. 17, n. 3, p. 684–696, 2016.
- BOTROM, P.; WU, J.; SPIEGELMAN M. B. *A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. [S.I.], *Nature*, v. 481, n. 7382, p. 463-468, 2012.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. *Óxido nítrico: revisão*. [S.I.], *Acta cirurgica brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.
- CLÉMENT, K.; FERRÉ, P. *Genetics and the pathophysiology of obesity*. [S.I.], *Pediatric Research*, v. 53, n. 5, p. 721–725, 2002.
- CORRALIZA, I. M. et al. *Determination of arginase activity in macrophages : a micromethod*. [S.I.], *Journal of immunological methods*, v. 174, p. 231-235, 1994.

DONG, J. et al. Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues. [S.I.], *International journal of obesity*, v. 40, n. 3, p. 434–442, 2016.

FUNES, S. C. et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. [S.I.], *Immunology*, v. 154, p. 186–195, 2018.

GHABEN, A. L.; SCHERER, E. P. Adipogenesis and metabolic health. [S.I.], *nature reviews molecular cell biology*, v. 20, n. 4, p. 242–258, 2019.

GLEESON, M. et al. *The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease*. [S.I.], *nature reviews immunology*, v. 11, n. 9, p. 607–610, 2011.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. [S.I.], *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 12, 7764–7768, 1981.

GRIESS, B. et al. Scavenging reactive oxygen species selectively inhibits M2 macrophage polarization and their pro-tumorigenic function in part, via Stat3 suppression. [S.I.], *Free Radical Biology and Medicine*, v. 147, p. 48–60, 2020.

HUANG, S. C. C. et al. Metabolic reprogramming mediated by the mtorc2-irf4 signaling axis is essential for macrophage alternative activation. [S.I.], *Immunity*, v. 45, n. 4, p. 817–830, 2016.

HUI, X. et al. Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting m2 macrophage proliferation. [S.I.], *Cell metabolism*, v.22, n. 2, p. 279-290, 2015.

INOUE, K. et al. Aerobic exercise training-induced irisin secretion is associated with the reduction of arterial stiffness via nitric oxide production in adults with obesity. [S.I.], *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v.45, n.7, p. 715–722, 2020.

JABLONSKI, K. A. et al. Novel markers to delineate murine m1 and m2 macrophages. *plos one* v. 10, n. 12, p. 2-25, 2015.

KASMI, K. C. E. et al. Toll-like receptor-induced arginase 1. [S.I.], *Nature Immunology*, v. 9, n. 12, p. 1399–1406, 2009.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from m1 to m2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. [S.I.], *Exercise immunology review*, v.16, p. 105–118, 2010.

KHANDEKAR, M. et al. Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. [S.I.], *Cell*, v. 150, n. 2, p. 366–376, 2012.

KIM, H. et al. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via α V Integrin Receptors. [S.I.], *Cell*, v. 175, n. 7, p. 1756–1768, 2018.

- KORTA, P.; POCHEC, E.; BIALY, M. A. et al. *Irisin as a Multifunctional Protein : Implications for Health and Certain Diseases*. [S.I.], *Medicina*, v. 55, n. 485, p. 1–14, 2019.
- LABONTÉ, J. et al. Distinct modulation of the endothelin-1 pathway in inos^{-/-} and enos^{-/-} mice. [S.I.], *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 86, n. 8, p. 516–525, 2008.
- LASCH, M. et al. Arginase inhibition attenuates arteriogenesis and interferes with m2 macrophage accumulation. [S.I.], *Laboratory investigation*, v. 96, n. 8, p. 830–838, 2016.
- LING, L. et al. Fibronectin type iii domain containing 5 attenuates nlrp3 inflammasome activation and phenotypic transformation of adventitial fibroblasts in spontaneously hypertensive rats. *journal of hypertension*. Xi'an: Laboratory of cardiovascular disease and molecular intervention, department of physiology, medical university, china, v. 35, n. 1, p. 1104-1114, 2017.
- LIU, Y. et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases. [S.I.], *International journal of biological sciences*, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014.
- MALONEY, J. et al. Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. [S.I.], *Microbes Infect.*, v.17, n. 6, p. 462–7, 2015.
- MAZUR, A. I. M. et al. New insight into the direct anti-inflammatory activity of a myokine irisin against proinflammatory activation of adipocytes. implication for exercise in obesity. [S.I.], *Journal of physiology and pharmacology*, v. 68, n. 2, p. 243-251, 2017.
- MAZUR, A. I. M. Irisin acts as a regulator of macrophages host defense. [S.I.], *Life Sciences*, v. 176, p. 21–25, 2017.
- MAZUR, A. I. M.; POCHEC, E. *The time-course of antioxidant irisin activity: Role of the nrf2/ho-1/hmgb1 axis*. [S.I.], *Antioxidants*, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2021.
- MAZUR, A. I. M. et al. Myokine irisin-induced protection against oxidative stress in vitro. involvement of heme oxygenase-1 and antioxidazing enzymes superoxide dismutase-2 and glutathione peroxidase. [S.I.], *Journal of physiology and pharmacology*, v. 69, n. 1, p. 117–125, 2018.
- Ministério da saúde. imc em adultos. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/component/content/article/804-imc/40509-imc-emadultos>>. Acesso em 02 nov. 2018.
- MORENO, N. et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. [S.I.], *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 98, n. 4, p. 769–778, 2013.
- MOSSER, M. D. The many faces of macrophage activation. [S.I.], *Journal of leukocyte biology*, v. 73, n. 2, p. 209–212, 2017.
- MURRAY, J. P.; WYNN, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. [S.I.], *Journal of leukocyte biology*, v. 89, n. 4, p. 557–563, 2011.

NATOLI, R. et al. Obesity induced metabolic disturbance drives oxidative stress and complement activation in the retinal environment. [S.I.], *Molecular vision* v. 24, p. 201–217, 2018.

NGUYEN, K. D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. [S.I.], *Nature*, v. 480, n. 7375, p. 104–108, 2012.

ODEGAARD, J. I. et al. Alternative (M2) activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. [S.I.], *Cell metab.* v. 7, n. 6, p. 496–507, 2009.

OLIVERA – PEREZ, H. M. et al. Omega-3 fatty acids increase the unfolded protein response and improve amyloid- β phagocytosis by macrophages of patients with mild cognitive impairment. [S.I.], *FASEB Journal*, v. 31, n. 10, p. 4359–4369, 2017.

ORECCHIONI, M. et al. *Macrophage polarization*: different gene signatures in m1(lps+) vs. classically and m2(lps-) vs. alternatively activated macrophages. [S.I.], *frontiers in immunology*, v. 10, p. 1–14, 2019.

PHAM P. V. et al. A simple in vitro method for evaluating dendritic cell-based vaccinations. [S.I.], *OncoTargets and Therapy*, v. 7, p. 1455–1464.

POLYZOS, S. A. et al. Irisin in metabolic diseases. [S.I.], *Endocrine*, v. 59, n. 2, p. 260–274, 2018.

REN, Y. F. et al. Irisin attenuates intestinal injury, oxidative and endoplasmic reticulum stress in mice with L-arginine-induced acute pancreatitis. [S.I.], *World Journal of Gastroenterology*, v. 25, n. 45, 2019.

RUTSCHMAN, R. et al. *Cutting Edge*: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. [S.I.], *The journal of immunology* v. 166, p. 22–27.

SHIMOBAYASHI, M. et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. [S.I.], *The Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 4, p. 1538–1550, 2018.

SIMÕES, R. L. et al. Lipoxin A4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. Rio de janeiro: *International Journal of Cancer*, v. 140, n. 2, p. 346–357, 2017.

SONOKI, T. et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. [S.I.], *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 6, p. 3689–3693, 1997.

SPIEGELMAN, B. M. *Regulation of adipogenesis*: Toward new therapeutics for metabolic disease. [S.I.], *Diabetes*, v. 62, n. 6, p. 1774–1782, 2013.

SPIEGELMAN, B. M.; Flier, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. *Massachusetts: Cell*, v. 104, n. 4, p. 531–543.

STEIN, M. et al. *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity*: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *Massachusetts: Journal*

of Experimental Medicine, v. 176, n. 1, p. 287–292, 1992.

TACANI, P. M. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. São Paulo: Fisioterapia e Pesquisa, v. 17, n. 2, p. 188–194, 2006.

WANG, Y. et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. [S.I.], International Immunopharmacology, v. 70, p. 459–466, 2019.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. Sergipe: Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia, v. 57, n.5, p. 339–345, 2013.

WRONSKA, A.; KMIĘC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. [S.I.], Acta Physiologica, v. 205, n. 2, p. 194–208, 2012.

XIN, C. et al. Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway. [S.I.], v. 40, n. 3, p. 443–451, 2015.

YANG, Z.; MING, X. F. *Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses*: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. [S.I.], Frontiers in Immunology, v. 5, p. 1–10 .

YAO, Q. et al. PPAR- γ induces the gene expression of integrin $\alpha\beta 5$ to promote macrophage m2 polarization. journal of biological chemistry, v. 5, n. 4, p. 1–24.

Ye, W. et al. The immunomodulatory role of irisin on osteogenesis via ampk-mediated macrophage polarization. [S.I.], International journal of biological macromolecules, v. 146, p. 25–35, 2020.

YUAN Y. et al. Arginase-1 deficiency. [S.I.], Journal of Molecular Medicine, v. 93, n. 12, p. 1287–1296, 2015.

ZHANG, M. et al. Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes M1 polarized macrophages in vivo. [S.I.], PLoS ONE, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2016.

ZHANG, Y. et al. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. Wuhu: International journal of molecular medicine, v. 31, n. 4, p. 797–802, 2012.

ZZOUH, X. et al. Exercise - induced myokine FNDC5 / irisin functions in cardiovascular protection and intracerebral retrieval of synaptic plasticity. [S.I.], Cell & Bioscience, v. 9, n. 1, p. 10–13.