

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**PAPEL DE FATORES SOLÚVEIS ASSOCIADOS À OBESIDADE NA
ATIVAÇÃO MACROFÁGICA DURANTE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Marco Antonio Marangon

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2019

MARCO ANTONIO MARANGON

**PAPEL DE FATORES SOLÚVEIS ASSOCIADOS À OBESIDADE NA
ATIVÇÃO MACROFÁGICA DURANTE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Imunologia e Doenças
Infecto-Parasitárias, apresentada como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e DIP

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Elaine de Almeida

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Marangon, Marco Antonio.

Papel de fatores solúveis associados à obesidade na ativação macrofágica durante infecção por *Trypanosoma cruzi* / Marco Antonio Marangon. -- 2019.

72 p.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida

Coorientadora: Heloísa D'Ávila

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Obesidade. 2. Doença de Chagas. 3. Metabolismo Lipídico. 4. Macrófago. 5. Adipócito. I. Almeida, Patrícia Elaine de, orient. II. D'Ávila, Heloísa, coorient. III. Título.

MARCO ANTÔNIO MARANGON

PAPEL DE FATORES SOLÚVEIS ASSOCIADOS À OBESIDADE NA ATIVAÇÃO
MACROFÁGICA DURANTE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 09 / 09 / 19.

BANCA EXAMINADORA:

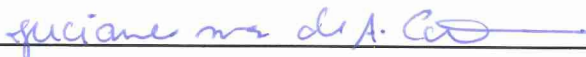


Prof.ª Dr.ª Patrícia Elaine de Almeida
Orientadora

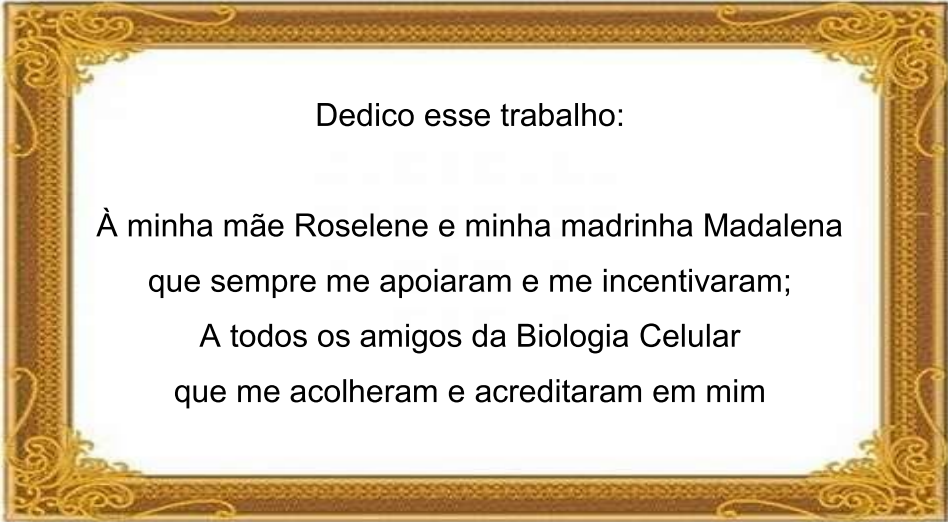
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Danielle de Oliveira Nascimento
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof.ª Dr.ª Juciane Maria de Andrade Castro
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dedico esse trabalho:

À minha mãe Roselene e minha madrinha Madalena
que sempre me apoiaram e me incentivaram;

A todos os amigos da Biologia Celular
que me acolheram e acreditaram em mim

**O próprio Senhor irá a sua frente
e estará com você; ele nunca o
deixará, nunca o abandonará.
Não tenha medo. Não se
desanime! (Deuteronômio 31,8)**

AGRADECIMENTOS

Com essa certeza do auxílio de Deus na minha caminhada, há dois anos me aventurava em uma nova etapa da minha vida; o ingresso na pós-graduação. Meu ingresso nessa nova etapa foi a maior vitória que pude receber e tudo foi resultado de muita luta, dedicação e fé.

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear com essa vitória, por ter me dado forças nas horas difíceis, esperança e motivação para seguir em frente na minha caminhada;

À minha mãe Roselene, pelo apoio e por torcer a cada dia pelo meu sucesso. O incentivo e suas palavras amigas e confortantes, a sabedoria com que me criou, os valores ensinados e o seu apoio na minha escolha, enfim, tudo o que me proporcionou foi essencial para a conquista dessa vitória;

À minha madrinha Madalena por todo esforço feito para que eu chegasse até aqui, pela sua dedicação e luta, pela preocupação de cada dia nas horas em que eu estava fora de casa, por cada vibração com meu sucesso, obrigado também pelo incentivo, compreensão e todo amor e carinho a mim dedicado;

À minha orientadora Dr^a Patrícia Elaine de Almeida pela acolhida e oportunidade de aprendizado, pela confiança depositada em minha pessoa e pela paciência de cada dia, seus ensinamentos e apoio foram muito importantes para meu crescimento e motivação;

À minha co-orientadora Dr^a Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro pela acolhida e oportunidade, pelas suas palavras amigas, pelas experiências compartilhadas e conselhos. Ter vocês Patrícia e Heloísa como orientadoras são um motivo enorme de orgulho e satisfação para mim. Obrigado por tudo;

À todos os professores da pós-graduação pela dedicação e paciência a cada aula e por toda experiência compartilhada que contribuíram muito para minha formação;

Gostaria de agradecer também, à banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Daniele Oliveira Nascimento e à Prof^a. Dr^a. Juciane Maria Andrade de Castro pela disponibilidade e por

todas as considerações, elogios, críticas, sugestões, ressalvas, contribuindo assim para o aperfeiçoamento e conclusão desse trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Eugênio Hootz, pelo suporte inicial e contribuições para que esse projeto fosse desenvolvido.

Meus agradecimentos em especial à Ana Luísa por todo auxílio e colaboração com o desenvolvimento desse projeto, pelas suas experiências compartilhadas, sua paciência em cada momento, pelas brincadeiras e descontrações e por toda amizade ao longo desses anos.

Agradeço a todos meus amigos e colegas de laboratório, Ana Luísa, Werner, Gabriel, Laíris, Polliane, Remy, Bianca, Beatriz, Luís, Gustavo, Adriana, Silvioney, obrigado pela amizade de vocês, pelos momentos de brincadeiras e descontrações e por tudo o que fizeram por mim e pelo desenvolvimento desse projeto. Sem vocês não estaria aqui hoje.

Aos meus amigos da escola Bíblica da paróquia Nossa Senhora das Graças pelas orações e torcida.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias e à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela oportunidade de realizar e finalizar esse projeto de mestrado e por todos os recursos oferecidos para concretização desse trabalho e aperfeiçoamento da minha capacidade profissional.

Meus agradecimentos também às agências de fomento que nos auxiliaram com recursos e financiamentos imprescindíveis: Capes, Fapemig, CNPq, Laboratório de Imunofarmacologia (FioCruz), PPGCBio, Laboratório de Bioquímica (UFJF) e ao Laboratório de Biologia Celular.

Obrigado a todos que fizeram parte dessa caminhada, pois sem vocês não chegaria aqui e também àqueles que mesmo distantes, sempre torceram pela realização dos meus sonhos e conquistas.

RESUMO

A obesidade representa um quadro preocupante na saúde pública mundial com números cada vez mais crescente nos diversos setores da sociedade. No Brasil os números são preocupantes, em 2014 os índices de sobrepeso e obesidade estavam em 52% e 17%, respectivamente. A obesidade é caracterizada como síndrome metabólica e um processo inflamatório de baixo grau conhecido como metainflamação. A ativação macrofágica por fatores solúveis secretados por adipócitos (FSA), são importantes na diferenciação de monócitos em macrófagos característicos do tecido adiposo. Além disso, uma mudança na polarização de macrófagos de perfil M2 para perfil M1, são características observáveis durante a obesidade. As disfunções metabólicas estão diretamente relacionadas com produção de citocinas pró-inflamatórias e apesar do impacto da obesidade em doenças metabólicas e cardiovasculares serem bem conhecidos, seu papel nas funções na ativação do sistema imune durante o curso de doenças infecciosas é pouco compreendido. Várias doenças podem ser comprometidas pela modulação de fatores associados a obesidade, entre elas a Doença de Chagas. Esta doença é uma zoonose negligenciada por atingir setores da classe baixa e de pouco interesse público. Trata-se de uma doença endêmica da América latina, mas apresenta-se em países do hemisfério norte devido a fatores como processo migratório, transfusões entre outros. Assim, este trabalho tem como objetivo traçar uma correlação entre FSA e a ativação de macrofágica durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Além disso, entender como os FSA podem ou não contribuir para a progressão da Doença de Chagas. Com foco na modulação do metabolismo lipídico, produção de citocinas e expressão de marcadores de perfil macrofágico M1 e M2. Neste estudo diferenciamos células NIH3T3-L1 em adipócitos e utilizamos o sobrenadante obtido a partir delas para estimular macrófagos peritoneais infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*. Os resultados demonstraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* induz uma maior biogênese de corpúsculos lipídicos nos tempos de 24, 48 e 72 horas e que foi potencializado na presença de FSA. A infecção induziu aumento na produção da citocina IL-10 nos tempos de 24, 48 e 72 horas apenas na presença de FSA. Para citocina TNF α , houve um aumento nos grupos infectados, efeito que não foi modulado pela presença de FSA, enquanto que a citocina KC aumentou nos grupos infectados e foi modulado pelos FSA somente no tempo de 24h. Além disso, verificamos que a infecção induziu um aumento da produção de óxido nítrico (NO) observado pelo aumento da produção de nitrito por macrófagos ativados e que esse aumento foi modulado pelos FSA somente no tempo de 24 horas. A infecção também induziu a expressão de PPAR γ nos tempos de 24, 48 e 72 horas e foi modulado pelos FSA no tempo de 72h.. Dessa forma nossos resultados sugerem um papel modulador dos fatores secretados por adipócitos na ativação de macrófagos, atribuídos ao aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, expressão de PPAR γ , síntese de citocinas como TNF- α e KC e uma modulação negativa da produção de IL-10 durante a infecção por *Trypanosoma cruzi in vitro*.

Palavras chaves: Adipócitos, Macrófagos, Corpúsculos Lipídicos, *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas.

ABSTRACT

Obesity represents a worrying picture in the world public health with increasing numbers in various sectors of society. In Brazil the numbers are worrying, in 2014 the rates of overweight and obesity were at 52% and 17%, respectively. Obesity is characterized as metabolic syndrome and a low-grade inflammatory process known as meta-inflammation. Macrophage activation by adipocyte-secreted soluble factors (FSA) is important in the differentiation of monocytes into characteristic adipose tissue macrophages. Moreover, a change in polarization of macrophages from M2 profile to M1 profile is observable characteristics during obesity. Metabolic dysfunctions are directly related to pro-inflammatory cytokine production and although the impact of obesity on metabolic and cardiovascular diseases is well known, its role in immune system activation during the course of infectious diseases is poorly understood. Several diseases may be compromised by the modulation of factors associated with obesity, including Chagas disease. This disease is a neglected zoonosis for reaching low-class sectors of little public interest. It is an endemic disease in Latin America, but it is present in northern hemispheric countries due to factors such as the migratory process, transfusions, among others. Thus, this paper aims to draw a correlation between FSA and macrophage activation during *Trypanosoma cruzi* infection. Also, understand how FSAs may or may not contribute to the progression of Chagas disease. Focusing on lipid metabolism modulation, cytokine production and expression of M1 and M2. macrophage profile markers In this study we differentiated NIH3T3-L1 cells into adipocytes and used the supernatant obtained from them to stimulate peritoneal macrophages infected or not with *Trypanosoma cruzi*. The results showed that *Trypanosoma cruzi* infection induces higher biogenesis of lipid body at 24, 48 and 72 hours and was potentiated in the presence of FSA. Infection induced increase in IL-10 cytokine production at 24, 48 and 72 hours only in the presence of FSA. For TNF α cytokine, there was an increase in infected groups, an effect that was not modulated by the presence of FSA, whereas cytokine KC increased in infected groups and was modulated by FSA only within 24h. In addition, we found that the infection-induced an increase in nitric oxide (NO) production observed by the increase of nitrite production by activated macrophages and that this increase was modulated by FSA only within 24 hours. Infection also induced PPAR γ expression at 24, 48 and 72 hours and was modulated by FSA at 72h. Thus our results suggest a modulating role of adipocyte-secreted factors in macrophage activation, attributed to increased lipid body biogenesis, PPAR γ expression, cytokine syntheses such as TNF- α and KC and negative modulation of IL-10 production during *Trypanosoma cruzi* infection *in vitro*.

Keywords: Adipocytes, Macrophages, Lipid body, *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 01 Distribuição mundial da Obesidade.....	16
FIGURA 02 Esquema demonstrando os diferentes tipos de adipócitos e suas composições estruturais.....	19
FIGURA 03 Esquema representativo do processo de adipogênese.....	21
FIGURA 04 Esquema representando a metainflamação do tecido adiposo.....	24
FIGURA 05 Distribuição mundial da Doença de Chagas.....	28
FIGURA 06 Ciclo da Doença de Chagas.....	29
FIGURA 07 Receptores associados à adesão parasito-célula.....	31
FIGURA 08 Representação da estrutura de corpúsculos lipídicos por microscopia de luz e eletrônica de transmissão.....	33
FIGURA 09 Biogênese de um corpúsculo lipídico a partir da membrana do RE.....	34
FIGURA 10 Interação entre <i>T.cruzi</i> e a célula hospedeira.....	35
FIGURA 11 Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1.....	37
FIGURA 12 - Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> , estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 24 h.....	42
FIGURA 13 Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 48.....	43
FIGURA 14 Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 72 h.....	44
FIGURA 15 Quantificação de IL-10 em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h.....	45
FIGURA 16 Quantificação de TNF α em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h.....	46
FIGURA 17 Quantificação de KC em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h.....	47

FIGURA 18 Quantificação de Óxido nítrico (NO) em macrófagos coletados

24, 48 e 72 h.....48

FIGURA 19 Expressão de PPAR γ49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

- AMPc:** adenosina 3',5'-monofosfato cíclico AMPc
- C/EBP:** Proteína de ligação ao intensificador CCAAT
- CLs:** corpúsculos lipídicos
- DEX:** Dexametasona
- EVs:** Vesículas extracelulares
- FBS:** Soro fetal bovino
- IBMX:** Metilisobutilxantina
- IGF-1:** Fator 1 de crescimento insulina semelhante à insulina
- IL:** Interleucina
- IL-10:** Interleucina 10
- IL-12:** Interleucina 12
- IL-1 β :** Interleucina1 β
- IL-6:** Interleucina 6
- iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível
- IFN- γ :** Interferon – gama
- INS:** Insulina (Ins),
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- MS:** Ministério da Saúde
- NF-K κ :** Fator nuclear
- NO:** óxido nítrico
- NOS:** Óxido nítrico sintase
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PGE 2:** Prostaglandinas 2
- PLIN 1:** Perilipinas
- PPAR γ :** Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos
- ROS:** espécies reativas de oxigênio
- SM:** síndrome metabólica
- TA:** Tecido adiposo
- TAB:** Tecido Adiposo Branco
- TAM:** Tecido adiposo marrom
- TGF β —** beta
- TF:** Fatores de transcrição
- TLR:** Receptor Toll-like
- TNF- α :** Fator de necrose tumoral – alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SAÚDE PÚBLICA.....	15
1.2 TECIDO ADIPOSEO E CONTROLE TRANSCRICIONAL DA ADIPOGÊNESE.....	16
1.3 PERFIL CELULAR DO TECIDO ADIPOSEO E METAINFLAMAÇÃO.....	21
1.4 METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO E VIAS DE ATIVAÇÃO INTRACELULAR NA DOENÇA DE CHAGAS.....	24
1.5 DOENÇA DE CHAGAS	
1.5.1 HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO.....	25
1.5.2 EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.5.3 INTERAÇÕES ENTRE <i>Trypanosoma cruzi</i> E A CÉLULA HOSPEDEIRA.....	29
1.5.4 A INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.....	31
1.6 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA DE CHAGAS E METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO.....	32

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	36

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1.....	36
3.2 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	38
3.3 CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEWBAUER	38
3.4 ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS DIFERENCIADOS.....	38

3.5	OBTENÇÃO E CULTURA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	39
3.6	INFECÇÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	39
3.7	COLORAÇÃO COM OIL RED O E CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	39
3.8	AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	40
3.9	WESTERN BLOT.....	40
3.10	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	41
3.11	DOSAGEM DE NITRITO.....	41
3.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
4.	RESULTADOS	
4.1	AVALIAÇÃO DA BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> , E ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS (FSA).....	42
4.2	ANÁLISE DAS CITOCINAS IL-10, TNF α KC EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM <i>Trypanosoma cruzi</i> , por 24, 48 e 72 h.....	45
4.3	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Trypanosoma cruzi</i> , ESTIMULADOS OU NÃO COM DE SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> , por 24, 48 e 72 h.....	47
4.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PPAR γ EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM <i>Trypanosoma cruzi</i> , ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS.....	48
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SAÚDE PÚBLICA

A Obesidade é considerada atualmente um grande problema de saúde pública em todo o mundo, sendo que sua prevalência vem aumentando consideravelmente chegando até mesmo dobrar em cerca de 70 países (AFSHIN; FOROUZANFAR; REITSMA; SUR *et al.*, 2017). O sobrepeso e a obesidade são considerados os principais fatores de risco para o desenvolvimento de várias doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, e até mesmo câncer (WHO 2016). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais apresentavam excesso de peso, dentre estes mais de 650 milhões eram obesos (Figura 01). Em relação à obesidade infantil, mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesas em 2016 e entre crianças menores de 5 anos, 41 milhões delas estavam acima do peso ou obesas em 2016 (WHO, 2016) **(FIGURA 01)**.

A obesidade caracteriza-se como um distúrbio multifatorial e também como um estado inflamatório de baixo grau, conhecido como metainflamação (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; MASTROCOLA; ARAGNO; ALLOATTI; COLLINO *et al.*, 2018) que pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles genéticos, ambientais e estilo de vida. A interação entre esses fatores pode ocasionar a expansão da massa gordurosa, promovendo o aumento das células adiposas em número e volume (SPALDING; ARNER; WESTERMARK; BERNARD *et al.*, 2008). Essa doença se manifesta com o acúmulo de diferentes níveis de gordura em diferentes locais do organismo. O depósito de gordura visceral na região intra-abdominal, por exemplo, oferece um risco muito maior no desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo II, aterosclerose e deslipidemia do que o depósito de gordura subcutânea ou periférica (OHLSON; LARSSON; SVARDSUDD; WELIN *et al.*, 1985). Dados de um estudo realizado pelo EPIC (European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition) sugeriram que tanto a adiposidade geral quanto a adiposidade abdominal estão relacionada com o risco de morte nos pacientes (PISCHON; BOEING; HOFFMANN; BERGMANN *et al.*, 2008).

Existem grandes diferenças entre os adipócitos que pertencem ao tecido adiposo (TA) subcutâneo e os que pertencem ao tecido adiposo visceral quanto à secreção de adipocinas, metabolismo e expressão de receptores. O tecido adiposo visceral drena seus metabólitos não diluídos e adipocinas para a veia porta, onde entram em contato com o fígado (LEFEBVRE; SCHEEN, 2001). Muitas das citocinas de natureza pró-inflamatória são secretadas pelo tecido adiposo visceral enquanto que a adiponectina, uma citocina anti-inflamatória, mostrou-se em

maior expressão no tecido adiposo subcutâneo (BLUHER, 2008; MOTOSHIMA; WU; SINHA; HARDY *et al.*, 2002).



FIGURA 01- Distribuição mundial da Obesidade. Os dados foram obtidos do site: abeso.org.br em 2017, e os valores são expressos com base na porcentagem da população total.

1.2. TECIDO ADIPOSEO E CONTROLE TRANSCRICIONAL DA ADIPOGÊNESE

O número de adipócitos que compõem o tecido de indivíduos magros e obesos é definido durante a infância e a adolescência, e apresenta pouca variação na idade adulta, o que permite sugerir que o principal fator que promove a expansão do TA durante a obesidade é de fato a hipertrofia de adipócitos. Esse mecanismo de hipertrofia dos adipócitos deve-se ao aumento do acúmulo de triglicerídeos no interior dessas células (SPALDING; ARNER; WESTERMARK; BERNARD *et al.*, 2008). Estudos recentes mostraram que pacientes com o fenótipo de hipertrofia no tecido adiposo, apresentaram uma maior tendência ao desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade e também o agravamento de inflamações crônicas de baixo grau (revisado em (KLOTING; STUMVOLL; BLUHER, 2007)).

Existem duas formas principais em que o TA pode aumentar, por meio da hipertrofia, quando as células adiposas existentes aumentam de tamanho, e por meio da hiperplasia, quando surgem novos adipócitos a partir de células precursoras denominadas de pré-adipócitos (SPALDING; ARNER; WESTERMARK; BERNARD *et al.*, 2008). Entretanto devido ao excesso calórico ingerido pelo indivíduo, pode ocorrer aumento desse número de adipócitos a partir da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos novos contribuindo dessa forma para a expansão do TA (VISHVANATH; MACPHERSON; HEPLER; WANG *et al.*, 2016; WANG; TAO; GUPTA; SCHERER, 2013). Quando os adipócitos aumentam de tamanho, eles experimentam um aumento do estresse mecânico devido ao contato com células vizinhas e também sofrem o efeito da hipoxia, efeitos estes que contribuem para a inflamação do TA (HALBERG; KHAN; TRUJILLO; WERNSTEDT-ASTERHOLM *et al.*, 2009; KHAN; MUISE; IYENGAR; WANG *et al.*, 2009).

Estudos evidenciaram que a variação no tamanho dos adipócitos está associada à sensibilidade à insulina, estresse oxidativo, parâmetros relacionados à processos inflamatórios e inclusive ao aumento do número de macrófagos no TA (BLUHER, 2008; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011) e que o tamanho do adipócito mostrou um fator relevante na secreção de adipocinas (BLUHER; WILSON-FRITCH; LESZYK; LAUSTSEN *et al.*, 2004; SKURK; ALBERTI-HUBER; HERDER; HAUNER, 2007). O conjunto dessas complicações metabólicas é conhecido como síndrome metabólica (SM) (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005) e se apresenta como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ISOMAA; ALMGREN; TUOMI; FORSEN *et al.*, 2001). A SM na população infantil tem sido destacada por meio da ocorrência de pressão arterial elevada, dislipidemia e resistência insulínica (ABRAMS; LEVITT KATZ, 2011). Sabe-se atualmente que tanto a obesidade infantil como adulta gera complicações em diferentes órgãos do corpo (EBBELING; PAWLAK; LUDWIG, 2002). As alterações metabólicas geradas pela obesidade infantil além de se caracterizar como um quadro de metainflamação, se apresenta com níveis séricos de adipocinas alterados (como TNF α , IL6, IL1 β , IL10, PAI-1, adiponectina, leptina, resistina), hormônios (insulina, grelina) (GHERLAN; VLADOIU; ALEXIU; GIURCANEANU *et al.*, 2012), além de modificações no perfil das células do sistema imune (SCHIPPER; PRAKKEN; KALKHOVEN; BOES, 2012).

Existem dois tipos diferentes de TA no organismo dos mamíferos, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O TAB está presente em maior proporção no organismo dos mamíferos e é responsável pela homeostasia energética, ação endócrina e sinalização de insulina, enquanto que o tecido adiposo marrom é responsável pela dissipação de energia na forma de calor, processo que ocorre na termogênese induzida por frio e dieta

(MOTA DE SA; RICHARD; HANG; STEPHENS, 2017). Ambos os tecidos são compostos, de uma grande diversidade de células como fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliais, pré-adipócitos, macrófagos, células T, além dos adipócitos, que representam a maioria tanto no TAB quanto no TAM (MOTA DE SA; RICHARD; HANG; STEPHENS, 2017).

Os adipócitos que compõem esses dois tecidos possuem diferenças morfológicas bem observadas entre eles. Os adipócitos brancos são esféricos possuem uma gotícula lipídica unilocular ocupando boa parte de seu citoplasma e deslocando as organelas para periferia da célula, enquanto que os adipócitos marrons são elipsóides e possuem gotículas lipídicas multiloculares com um núcleo bem centralizado no seu citoplasma (CINTI, 2005). Além dessas características, os adipócitos marrons também possuem abundante presença de mitocôndrias contendo ferro-citocromo em seu citoplasma, o que os diferem dos adipócitos brancos e conferem a eles uma cor amarronzada. Também possuem elevada concentração da proteína transportadora de prótons (UCP-1) (CANNON; HEDIN; NEDERGAARD, 1982).

Vários fatores que podem modular a formação de adipócitos já foram descritos. Alguns hormônios endócrinos como a insulina, fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), hormônio de crescimento, e também alguns hormônios esteróides são exemplo desses fatores. Algumas citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o interferon inibem o desenvolvimento dos adipócitos (SARJEANT; STEPHENS, 2012). Outros fatores também são conhecidos por modular a adipogênese são as proteínas quinase C e o AMPc (revisado em (MATHIEU; LOBOA, 2012)).

A adipogênese é o processo no qual pré-adipócitos se diferenciam e se transformam em adipócitos maduros (LEFTEROVA; LAZAR, 2009; ROSEN; MACDOUGALD, 2006). Os adipócitos têm sua origem proveniente de células tronco mesenquimais que se transforma em fibroblastos, que por sua vez dão origem aos pré-adipócitos e finalmente em adipócitos maduros (**FIGURA 02**) (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998). Os tipos de células mais utilizados para estudar o processo de adipogênese são os pré-adipócitos semelhantes a fibroblastos comprometidos com a diferenciação em adipócitos e incluem diversas linhagens celulares, entre elas 3T3-L1, 3T3-F442A, OP9, 1246, Ob1771, TA1 e 30A5 (MOTA DE SA; RICHARD; HANG; STEPHENS, 2017). O modelo mais amplamente utilizado é a linhagem celular 3T3-L1 (LAI; CHEN; LEE; KALYANAM *et al.*, 2016; TUTINO; ORLANDO; RUSSO; NOTARNICOLA, 2016).

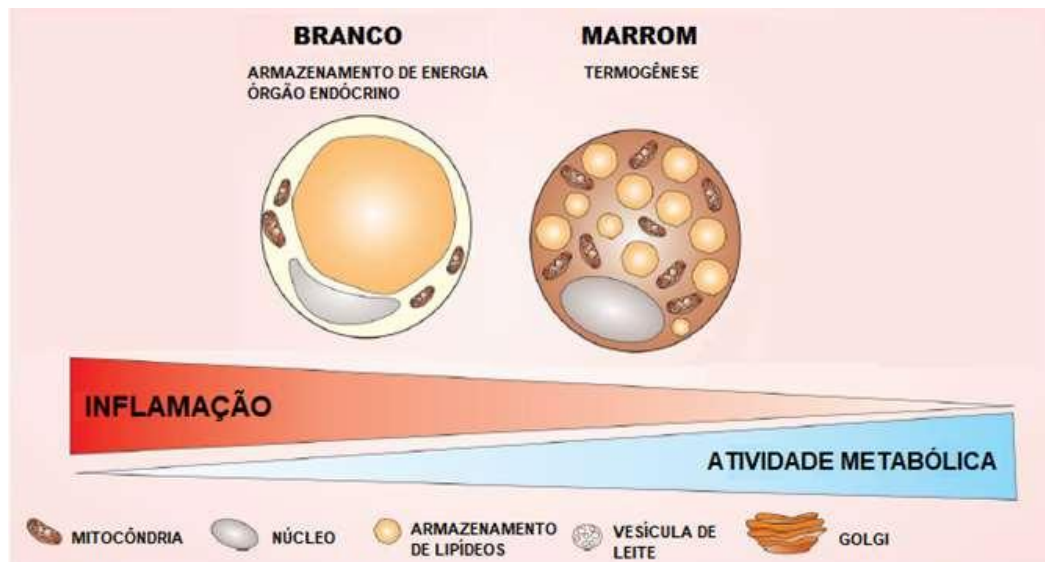


FIGURA 02- Esquema demonstrando os diferentes tipos de adipócitos e suas composições estruturais. O adipócito branco possui poucas mitocôndrias (estruturas em marrom) em seu citoplasma e abriga uma única gotícula de gordura. As organelas desse tipo de adipócito se encontram deslocadas para a região periférica da célula. Enquanto isso, o adipócito marrom possui várias mitocôndrias, o que lhe confere a cor amarronzada, além de possuir várias gotículas de gordura em seu citoplasma. O adipócito branco possui função de armazenamento de energia enquanto que o marrom possui o papel de termogênese. Fonte: (CORREA; HEYN; MAGALHAES, 2019).

O processo transcricional na adipogênese é regulado por certos fatores de transcrição, entre os principais está o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gamma (PPAR γ), a proteína de ligação alfa-estimuladora de CCAAT (C / EBP α) (FARMER, 2006; LEFTEROVA; LAZAR, 2009; ROSEN; HSU; WANG; SAKAI *et al.*, 2002) e fatores de transcrição da proteína de ligação do elemento regulatório (SREBP) (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Estudos demonstraram que o processo de adipogênese necessita da ativação e participação do PPAR γ tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HU; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 1995; ROSEN; SARRAF; TROY; BRADWIN *et al.*, 1999).

O PPAR γ pode se apresentar de diferentes isoformas, entre as conhecidas destaca-se o PPAR γ 2 que está altamente presente no TA, participa da diferenciação dos adipócitos, no armazenamento de triacilgliceróis e está envolvido em alterações metabólicas como dislipidemia, diabetes tipo II, obesidade e resistência insulínica (SARRAF; SHARMA; MONDAL; GARG *et al.*, 2012). Primeiramente a adipogênese ocorre quando uma célula-tronco mesenquimal multipotente indiferenciada (MSCs) sob a influência de hormônios, insulina e fatores de crescimento, se diferencia transformando-se em pré-adipócito (NIEMELÄ; MIETTINEN; SARKANEN; ASHAMMAKHI, 2008) e após essa etapa, passam por um estágio de determinação no qual se tornam adipócitos carregados de lipídeos internamente (NIEMELÄ;

MIETTINEN; SARKANEN; ASHAMMAKHI, 2008; RAYALAM; DELLA-FERA; BAILE, 2008). O processo de adipogênese também pode ser induzido a partir de um coquetel estimulante *in vitro*, no qual é formado pela dexametasona (que ativa o receptor de glicocorticóides), a insulina (que ativa o receptor IGF-1) e o IBMX (que ativa a via de sinalização da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). A partir daí há expressão das proteínas de ligação ao intensificador CCAAT (C/EBPs): C/EBP- β e C/EBP- δ que representa o início do processo de diferenciação (FARMER, 2006). Após essa etapa, os pré-adipócitos com crescimento interrompido passam por um ciclo de expansão clonal mitótica sofrendo sucessivas divisões mitóticas (PATEL; LANE, 2000). E na última etapa do processo de adipogênese, os fatores de transcrição C / EBP α e o PPAR γ são ativados e entram em ação (ZHAO; GREGOIRE; SOOK SUL, 2000). Então os pré-adipócitos saem do ciclo celular e sofrem a diferenciação terminal, etapa no qual perdem sua característica morfológica de fibroblasto, acumulam triglicérides citoplasmáticos e por fim adquirem características de um adipócito maduro (**FIGURA 03**) (NIEMELÄ; MIETTINEN; SARKANEN; ASHAMMAKHI, 2008). Para que a transformação da morfologia do pré-adipócito ocorra de uma forma alongada para esférica, é necessário a degradação proteolítica da matriz extracelular estromal (MEC) dos pré-adipócitos pela cascata de plasminogênio, que também é necessária para que ocorra o acúmulo lipídico citoplasmático (SELVARAJAN; LUND; TAKEUCHI; CRAIK *et al.*, 2001). O coquetel estimulante adipogênico promove a expressão de proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *myc* que dão início a mitose e conseqüentemente o desenovelamento das hélices do DNA facilitando o processo de fatores de transcrição e genes-alvos envolvidos na diferenciação celular que cessam sua expressão entre duas e três horas após o tratamento (WHITE; STEPHENS, 2010).

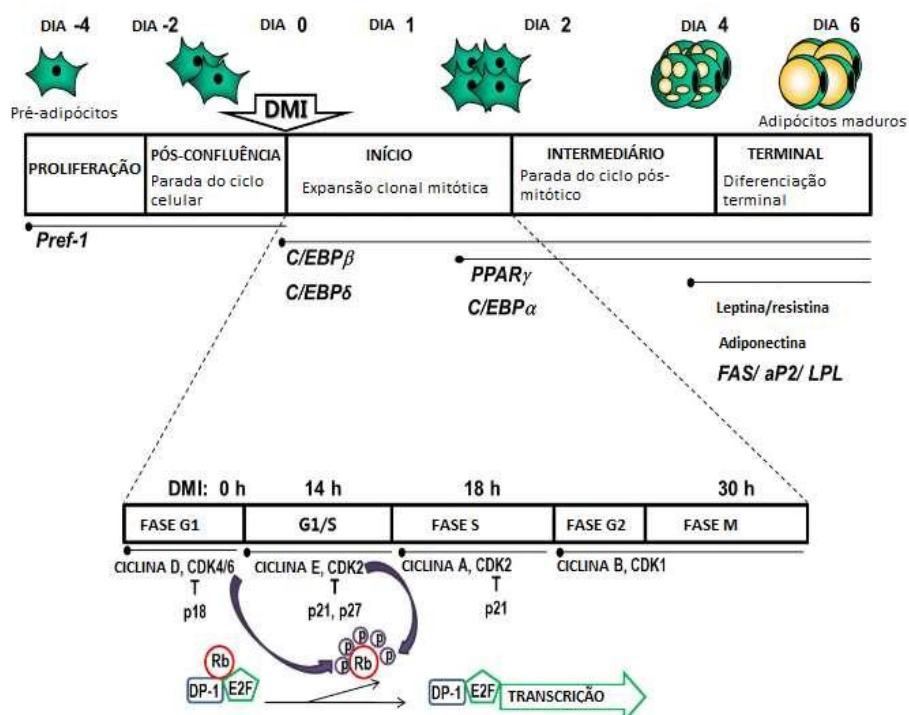


FIGURA 03- Esquema representativo do processo de adipogênese. Após a administração do coquetel adipogênico (DMI), os pré-adipócitos cessam o ciclo de divisão celular e entram na fase de diferenciação que inclui três etapas: Período inicial, Intermediário e terminal. Fonte: (CHANG; KIM, 2019).

1.3 PERFIL CELULAR DO TECIDO ADIPOSO E META-INFLAMAÇÃO

O TA é composto por inúmeras células residentes do sistema imune que são responsáveis pela limpeza e manutenção da homeostase do tecido o qual ocorre também em indivíduos não obesos (SCHIPPER; RAKHSHANDEHROO; VAN DE GRAAF; VENKEN *et al.*, 2012). O acúmulo com excesso de gorduras no TA leva a uma disfunção local, resultando em polarização de células do sistema imune, colaborando para o aumento de macrófagos, mastócitos, neutrófilos e Linfócitos T e B e uma redução de células T helper 2, T-reguladoras (T-reg) e NKT (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013). Os macrófagos são as células-chave no controle dessa homeostase do tecido adiposo, pois podem ser ativados por uma série de sinais e desencadear processos inflamatórios ou então contribuem para reparo tecidual e angiogênese (RUF; SAMAD, 2015).

Os Adipócitos hipertróficos-hiperplásicos deixam de responder adequadamente a sinais insulínicos por exibir maior quantidade de receptores beta-adrenérgicos do que insulínicos, facilitando a diapedese de monócitos para o local, corroborando para o aparecimento de um

ciclo pró-inflamatório no tecido adiposo (revisado em (MAURIZI; DELLA GUARDIA; MAURIZI; POLONI, 2018)). Acredita-se que o excesso nutricional continuamente desencadeia um estresse oxidativo intracelular e aumenta o estado de inflamação juntamente com a elevação de marcadores inflamatórios (HOTAMISLIGIL, 2010). O aumento do número de adipócitos pode ser tolerado, mas o aumento do tamanho dessas células gera hipertrofia e desencadeia estresse celular, que é prejudicial ao funcionamento adequado do TA (COTILLARD; POITOU; TORCIVIA; BOUILLOT *et al.*, 2014). Essas alterações no TA, compromete sua funcionalidade e leva morte celular (COTILLARD; POITOU; TORCIVIA; BOUILLOT *et al.*, 2014).

Além de citocinas e adipocinas solúveis, outros fatores como as vesículas extracelulares (VEs) liberadas por adipócitos, também podem influenciar no papel de sinalização celular no TA. As propriedades morfológicas e estruturais que as VEs apresentam permitem que elas apresentem interações em células-alvos, desempenhando importantes contribuições em muitos processos patológicos (BUSCHOW; NOLTE-'T HOEN; VAN NIEL; POLS *et al.*, 2009; MULLER; JUNG; STRAUB; WIED *et al.*, 2009).

As VEs possuem um formato esférico e são constituídas de uma bicamada lipídica externa, sendo liberadas de quase todas as células vivas desde simples bactérias até organismos multicelulares (GHO; LEE, 2017). Estão envolvidas em inúmeros efeitos inibitórios e estimulatórios, incluindo a proliferação celular, produção de citocinas, metabolismo e apoptose (HUANG-DORAN; ZHANG; VIDAL-PUIG, 2017). Estudo realizado por Kranendonk *et al.*, 2014, avaliou uma importante relação entre VEs extraídas de adipócitos humanos e macrófagos. Esse estudo verificou que as VEs isoladas a partir de adipócitos diferenciados *in vitro* induzem a diferenciação de monócitos em macrófagos com um fenótipo pró e anti-inflamatório (KRANENDONK; VISSEREN; VAN BALKOM; NOLTE-'T HOEN *et al.*, 2014). Além do mais o referido estudo também verificou uma relação entre a ativação macrofágica induzida por VEs sobre a sinalização da insulina, sugerindo que os adipócitos humanos, *in vitro* e *ex vivo*, produzem VEs com propriedades imunomoduladoras, o que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência insulínica (IR) local, um fator relevante na relação entre obesidade e complicações metabólicas adversas (DANDONA; ALJADA; BANDYOPADHYAY, 2004; KRANENDONK; VISSEREN; VAN BALKOM; NOLTE-'T HOEN *et al.*, 2014).

Além disso, os adipócitos quando hipertrofiados secretam uma quantidade anormal de adipocinas e promovem quimiotaxia de macrófagos (GUILHERME; VIRBASIU; PURI; CZECH, 2008). Estudos de Debels *et al.* 2013, mostraram a importância dos macrófagos para o processo de adipogênese, ao relatarem que tanto o processo de angiogênese quanto a adipogênese foram inibidas na ausência dessas células (DEBELS; GALEA; HAN; PALMER *et al.*, 2013).

Os macrófagos ativados são classificados basicamente como: macrófago classicamente ativado (M1) que estão associados a respostas inflamatórias e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e o macrófago alternativamente ativado (M2) que estão associados ao reparo tecidual e à produção de citocinas antiinflamatórias (LICHTNEKERT; KAWAKAMI; PARKS; DUFFIELD, 2013). Macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL-12) e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) enquanto que os macrófagos de perfil M2 expressam CD206, arginase-1, IL-10, fatores que estão envolvidos no reparo ou remodelação dos tecidos (GORDON; MARTINEZ, 2010; GORDON; TAYLOR, 2005; MANTOVANI; SICA; SOZZANI; ALLAVENA *et al.*, 2004). Estudo recente de Cheng *et al.*, 2019, demonstrou que o sobrenadante de macrófagos M1 apresentou mais citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-12 e a enzima óxido nítrico sintase induzível (INOS), enquanto que o sobrenadante de macrófagos M2 apresentou mais citocinas anti-inflamatórias e pró-regenerativas, como IL-10 e TGF- β (CHENG; LUAN; MU; WANG *et al.*, 2019). Esse estudo também demonstrou que o sobrenadante de macrófagos M1 suprimiam a expressão de proteína de C / EBP- α e PPARc, os dois principais fatores de transcrição regulados positivamente durante o processo de adipogênese. Enquanto, que macrófagos M2 não apresentaram nenhuma interferência na expressão dos mesmos (CHENG; LUAN; MU; WANG *et al.*, 2019).

O TA em estado obeso é alvo da infiltração de macrófagos tanto em humanos quanto em roedores (WEISBERG; MCCANN; DESAI; ROSENBAUM *et al.*, 2003) e essa infiltração pode aumentar consideravelmente a massa de gordura corporal e ocasionar a hipertrofia de adipócitos (CANCELLO; CLEMENT, 2006; HARMAN-BOEHM; BLUHER; REDEL; SION-VARDY *et al.*, 2007) (**FIGURA 04**). Macrófagos ativados no tecido adiposo podem produzir níveis elevados de citocinas como TNF- α , IL-6 e de adipocinas como resistina e leptina em diferentes depósitos do tecido adiposo que podem contribuir para a mudança na sensibilidade à insulina (BLUHER, 2008).

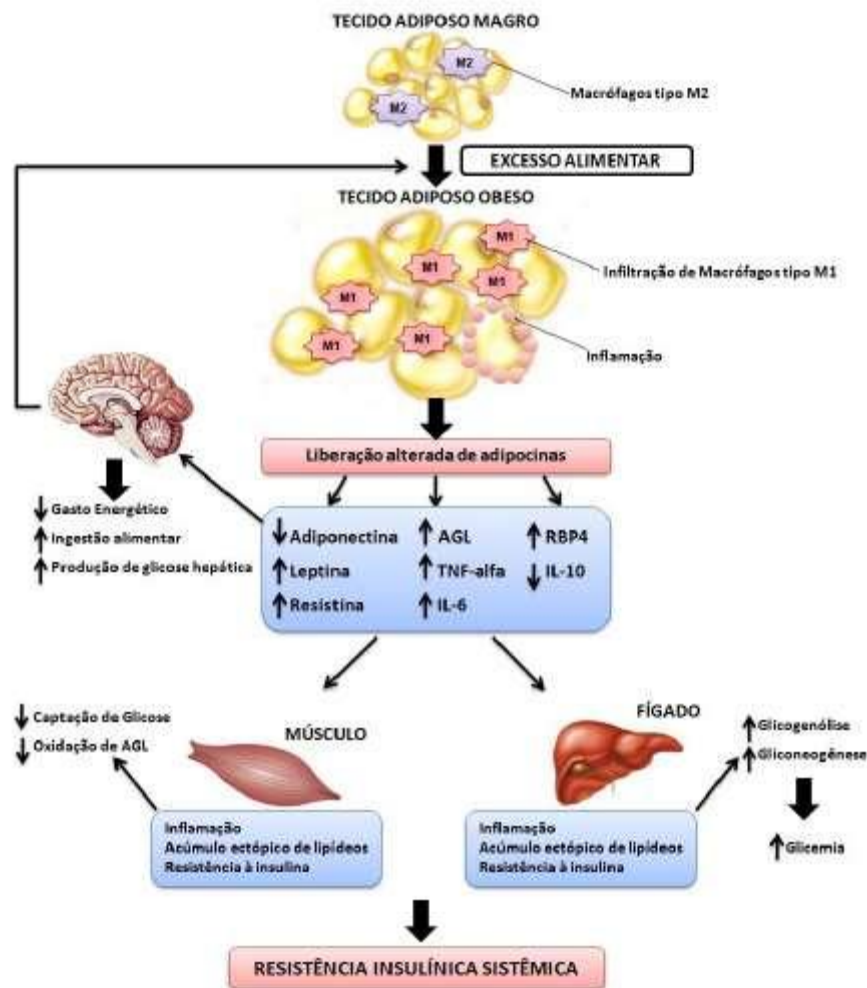


FIGURA 04- Esquema representando a metainflamação do TA. O aumento do TA gera uma hipertrofia dos adipócitos, que por sua vez promove infiltração e proliferação de macrófagos. Com isso o tecido adiposo começa a secretar fatores conhecidos como adipocinas, a maioria pró-inflamatórias como TNF α , leptina, resistina, MIF-1, MIP, PAI-1, entre outras, caracterizando um processo de baixo grau inflamatório conhecido como metainflamação que é resultado da ativação duradoura do sistema imune, com recrutamento de macrófagos para o TA obeso. Fonte: Adaptado de (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010).

1.4 METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO E VIAS DE ATIVAÇÃO INTRACELULAR NA DOENÇA DE CHAGAS

Um importante estudo realizado recentemente estabeleceu uma associação entre a infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* e a homeostase do tecido adiposo envolvendo participação do PPAR γ (GONZALEZ; VILLAR; TONEATTO; PACINI *et al.*, 2019). Esse e outros autores demonstraram que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, desencadeou a perda de peso de camundongos C57Bl/6 infectados e de massa tecidual adiposa (COMBS; NAGAJYOTHI;

MUKHERJEE; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; GONZALEZ; VILLAR; TONEATTO; PACINI *et al.*, 2019; MANARIN; VILLAR; FERNANDEZ BUSSY; GONZALEZ *et al.*, 2013).

Muitos autores têm proposto o TA como reservatório do *Trypanosoma cruzi* durante a infecção crônica em humanos e animais, visto que os adipócitos também são alvos desse parasita (COMBS; NAGAJYOTHI; MUKHERJEE; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; NAGAJYOTHI; DESRUISSEAU; MACHADO; UPADHYA *et al.*, 2012). Além do mais, os resultados propostos por González *et al.*, 2019, evidenciaram que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* promove um estado inflamatório no TA, com aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-6, regulação das vias lipogênicas e lipolíticas, atrofia dos adipócitos com perda tecidual, diminuição da expressão da enzima lipogênica (aciltransferase-DGAT) e promove a perda do fenótipo maduro dos adipócitos 3T3-L1 *in vitro*. Paralelo a esses dados, o estudo também demonstrou que o tratamento com agonistas de PPAR γ (15-dPGJ2 (PGJ) ou rosiglitazona (Rsg) restabeleceu as funções metabólicas dos camundongos infectados mas não obteve controle do processo infeccioso (GONZALEZ; VILLAR; TONEATTO; PACINI *et al.*, 2019).

Outro estudo mostrou que a infecção por adipócitos com a cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*, levou o TA ser um dos principais locais de inflamação durante a progressão da doença de Chagas demonstrando um aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios (NAGAJYOTHI; DESRUISSEAU; THIRUVUR; WEISS *et al.*, 2008). Uma diminuição da adipocina conhecida como adiponectina e do PPAR γ associada à infecção em adipócitos infectados foi descrita em estudos de Nagajyothi *et al.*, 2008. Assim, fica evidenciado que a redução nos níveis de adiponectina está correlacionada a um aumento da inflamação e que existe uma relação inversa entre o PPAR γ e a inflamação (NAGAJYOTHI; DESRUISSEAU; THIRUVUR; WEISS *et al.*, 2008).

1.5 DOENÇA DE CHAGAS

1.5.1 HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO

Apesar de ser conhecida há mais de 100 anos, a Doença de Chagas ainda é uma doença negligenciada no Brasil e em outros países (HOTEZ; MOLYNEUX; FENWICK; KUMARESAN *et al.*, 2007; YACOUB; MOCUMBI; YACOUB, 2008). Essa doença é causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*, representa um sério problema sócio-econômico em

toda a América latina e chega a desenvolver cardiomiopatia em cerca de 30% dos pacientes infectados (BONNEY, 2014).

Evidências apontam indícios de infecção por Doença de Chagas em múmias do Chile e Peru com mais de 9000 anos de idade (AUFDERHEIDE; SALO; MADDEN; STREITZ *et al.*, 2004). Entretanto, a história da doença de Chagas foi documentada pela primeira vez pelo médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), cujo sobrenome foi atribuído à nomenclatura da doença (CHAGAS, 2008). Examinando animais da fauna da região, Carlos Chagas, descobriu um protozoário flagelado que estava infectando exclusivamente micos, na qual o denominou *Trypanosoma minasense*. Após novos estudos, identificou no tubo digestivo de “barbeiros”, um inseto hematófago, um novo tripanossoma diferente do anterior, de cinetoplasto extremamente denso e movimentação intensa (FITARELLI; HORN, 2009).

Em 1909, Carlos Chagas, enviou amostras de barbeiros infectados ao laboratório de Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Após infectar micos, ficou comprovada a suspeita de Chagas de que este tripanossoma deveria ser uma espécie nova que circularia entre barbeiros, mamíferos e, talvez, humanos. A partir daí, Carlos Chagas procurou o protozoário no sangue de pessoas residentes em casas infestadas por barbeiros. Em homenagem a Oswaldo Cruz, Chagas denominou a espécie descoberta de *Trypanosoma cruzi* e desta forma descobriu uma nova doença humana, a tripanossomíase americana ou Doença de Chagas (CHAGAS, 2008; KROPF; SÁ, 2009)

No dia 14 de abril de 1909, ao examinar o sangue de uma criança febril, de dois anos de idade, Berenice, que Carlos Chagas identificou o protozoário, antes encontrado em barbeiros. A mãe de Berenice relatou a Chagas que sua filha havia sido picada por um barbeiro e também relatou quais sintomas a menina havia apresentado (KROPF; SÁ, 2009). Carlos Chagas então estudou o parasito, seu ciclo evolutivo no vertebrado e invertebrado, insetos vetores e seus reservatórios, a clínica inerente à fase aguda da doença, a patologia, a epidemiologia da doença e a sintomatologia inerente à fase aguda da doença, o seu primeiro diagnóstico parasitológico (gota espessa) e as formas de tratamento. Além disso, tornou notável às autoridades a importância médica e social da doença (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

1.5.2 EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas é considerada uma das vinte doenças negligenciadas no mundo de acordo com a Organização Mundial da saúde (OMS) (WHO, 2018). Estima-se que entre 6 a 7 milhões de pessoas estejam contaminadas com a Doença de Chagas em todo o mundo, sendo a América Latina o continente que representa a maioria dos casos da doença (WHO, 2018), (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Pelo menos 120 milhões de pessoas se encontram em riscos nessas áreas (SALVATELLA; IRABEDRA; SANCHEZ; CASTELLANOS *et al.*, 2013). A Doença de Chagas também está se tornando um problema de saúde em países não endêmicos como EUA e países europeus, devido ao processo de migração (NUNES; DONES; MORILLO; ENCINA *et al.*, 2013; SCHMUNIS; YADON, 2010). No Brasil cerca de 1 milhão de pessoas são portadoras da Doença de Chagas segundo dados do Ministério da Saúde (MS), sendo que 95 % desses casos estão presentes na região norte, predominando no estado do Pará com 83 % dos casos. Quanto às formas de transmissão da doença, 72 % dos casos se deram por transmissão oral, 9 % por transmissão vetorial e em 18% dos casos não foi possível a identificação da transmissão (MS, 2019). Estimativas recentes demonstraram uma variação do número de chagásicos entre 1,0 a 2,4 % da população, o que representa em números 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Isso contribui para que a Doença de Chagas se torne uma das quatro maiores causa de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no país (MS, 2019) **(FIGURA 05)**.



FIGURA 05- Distribuição mundial da Doença de Chagas. A Doença de Chagas se encontra predominantemente em países da América Latina (em cor cinza claro) e também em países do hemisfério norte (tons coloridos) devido a processos migratórios. Fonte: (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010)

O protozoário *Trypanosoma cruzi* possui várias fases do ciclo de vida. Nos hospedeiros mamíferos se apresenta sob as formas tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea e as formas amastigotas, que são replicativas e intracelulares. Já nos vetores, apresenta-se sob as formas de epimastigotas e tripomastigotas metacíclica, a forma infectante. Após infectar as células, essas formas tripomastigotas se convertem nas formas amastigotas na qual sofrem replicação no citoplasma das células hospedeiras. Essas células sofrem rompimento e liberam novas formas tripomastigotas prontas para invadir novas células (GUARNER, 2019) **(FIGURA 06)**. Novos estudos apontam a existência de formas intermediárias entre tripomastigota e epimastigota (GONCALVES; AVILA; DE SOUZA; MOTTA *et al.*, 2018; ROMANIUK; FRASCH; CASSOLA, 2018) sendo que algumas dessas formas também capazes de infectar células (KESSLER; CONTRERAS; MARLIERE; APARECIDA GUARNERI *et al.*, 2017).

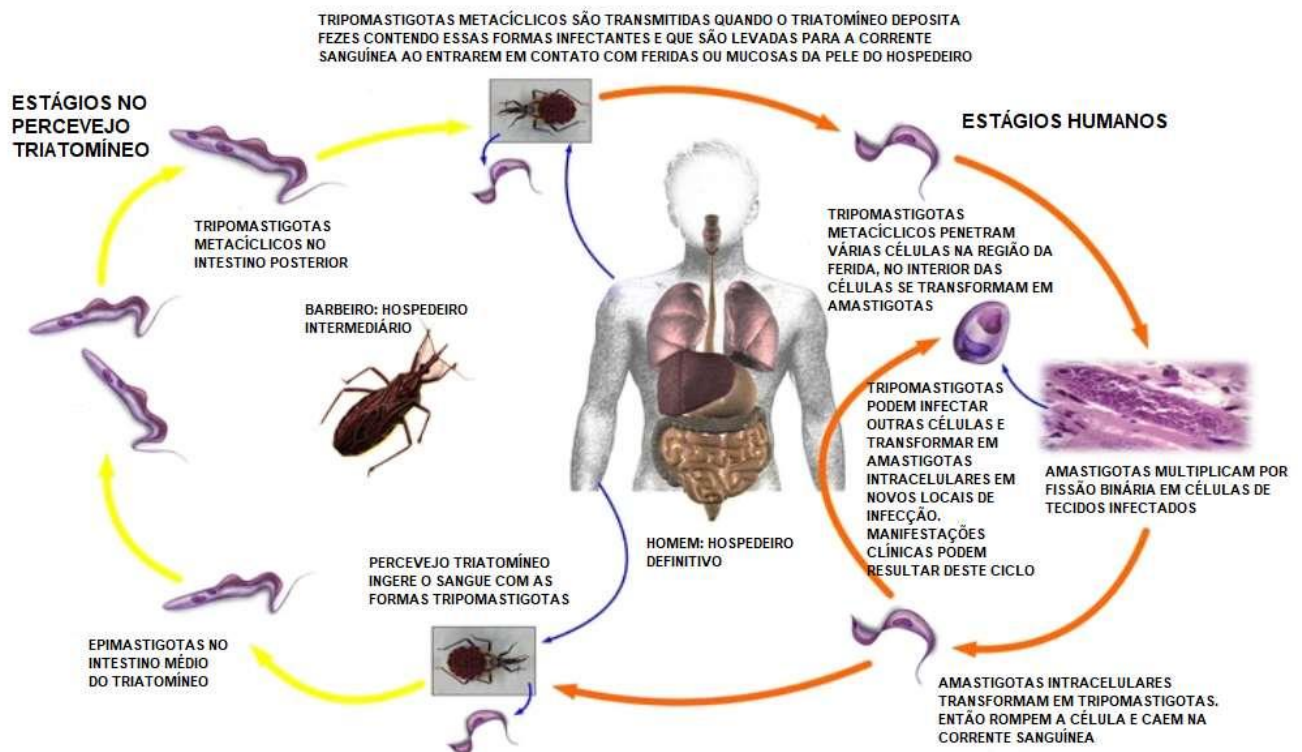


FIGURA 06- Ciclo da Doença de Chagas. O ciclo da Doença de Chagas possui uma fase de desenvolvimento no homem, o hospedeiro definitivo e uma fase no barbeiro, o hospedeiro intermediário e transmissor da doença. Fonte: (LIU; ZHOU, 2015).

1.5.3 INTERAÇÕES ENTRE *Trypanosoma cruzi* E A CÉLULA HOSPEDEIRA

As formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* quando ingeridas pelo barbeiro, ao sugar o sangue de vertebrados infectados, se transformam em poucos dias em uma forma esférica denominada de esferomastigotas ou em epimastigotas. Essas formas epimastigotas migram-se para o intestino do inseto onde se dividem intensamente e se aderem às microvilosidades das células do intestino médio posterior (ALVES; ALBUQUERQUE-CUNHA; MELLO; GARCIA *et al.*, 2007; NOGUEIRA; GONZALEZ; GOMES; SOUZA *et al.*, 2007). Na região mais posterior do reto do inseto, as formas epimastigotas se desprendem dessa superfície e se transformam em forma tripomastigotas metacíclicas que são liberadas pelo barbeiro juntamente com as fezes e urina (GARCIA; RATCLIFFE; WHITTEN; GONZALEZ *et al.*, 2007).

O processo de interação *Trypanosoma cruzi* com a célula hospedeira no organismo do vertebrado compreende basicamente três estágios diferentes: adesão e reconhecimento,

sinalização e invasão (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). O processo de adesão envolve o reconhecimento entre inúmeras moléculas de superfície presentes na célula hospedeira e no parasito (de Sousa, de Carvalho, Barrias, 2010). Primeiramente, para que ocorra internalização do *Trypanosoma cruzi* à célula hospedeira é necessário a participação de moléculas de cálcio (Ca^{2+}) intracelular que contribuem para que o processo ocorra (YOSHIDA, 2006). Moléculas conhecidas como mucinas também participam do processo de adesão e invasão. Mucinas são glicoproteínas de superfície do *Trypanosoma cruzi*, formadas por resíduos de açúcar que interagem com as células hospedeiras (revisado em (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Além da mucina, outras glicoproteínas também são utilizadas pelo *Trypanosoma cruzi* no processo de adesão celular como trans-sialidases (ativas e inativas) e glicoproteínas (gp82, gp80, gp35/50 e gp85) (SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991).

A maioria das moléculas presentes na superfície da célula hospedeira pode ser um ligante para os receptores de *Trypanosoma cruzi*, mas a maioria delas caracterizadas são carboidratos que contêm resíduos de galactosil, manosil e sialil (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010) e galectina 3, uma proteína semelhante à lectina que tem o papel de se ligar nos resíduos de carboidratos presentes na superfície da membrana do *Trypanosoma cruzi* (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2000; VRAY; CAMBY; VERCRUYSSSE; MIJATOVIC *et al.*, 2004). A lectina tem o papel de promover a regulação da resistência do hospedeiro e da inflamação cardíaca na Doença de Chagas (ROTHFUCHS; ROFFE; GIBSON; CHEEVER *et al.*, 2012).

Dois receptores moleculares também utilizados pelo parasito são a endotelina 1 e bradicinina que permitem as formas tripomastigotas invadirem células cardiovasculares, contribuindo para uma vasculopatia chagásica (ANDRADE; SERRA; SVENSJO; LIMA *et al.*, 2012).

Uma molécula receptora denominada Tc85, presente na superfície do tripomastigota, possui estruturas que se ligam em várias outras moléculas presentes na superfície da célula como a Citoqueratina 18 (MAGDESIAN; GIORDANO; ULRICH; JULIANO *et al.*, 2001), fibronectina (OUAISSI; CORNETTE; AFCHAIN; CAPRON *et al.*, 1986), laminina (GIORDANO; FOUTS; TEWARI; COLLI *et al.*, 1999) (**FIGURA 07**). Estudos de Barbosa e Meirelles, 1995 utilizando células cardíacas, demonstraram por microscopia eletrônica de transmissão que tripomastigotas se ligam e induzem um processo fagocítico típico com extensões de pseudópodes da célula hospedeira. No contato entre tripomastigota e células fagocitárias profissionais, ocorre a ativação de tirosina-quinase seguida do recrutamento da PI3-quinase,

que resulta na polimerização dos microfilamentos de actina que por sua vez, irão promover a extensão dos pseudópodes (BARBOSA; MEIRELLES, 1995).

Estudos demonstraram que certos microdomínios da membrana plasmática da célula hospedeira estão envolvidos na entrada do *Trypanosoma cruzi* em células não fagocíticas e fagocíticas (BARRIAS; DUTRA; DE SOUZA; CARVALHO, 2007; FERNANDES; CORTEZ; GERALDO YONEYAMA; STRAUS *et al.*, 2007). No processo de internalização do parasito pela célula hospedeira, marcadores moleculares como flotilina 1, caveolina 1 e GM1, foram observados na interface da membrana plasmática, entre o parasito e a célula hospedeira, sugerindo a participação de microdomínios na internalização do *Trypanosoma cruzi* por essas células (BARRIAS; DUTRA; DE SOUZA; CARVALHO, 2007).

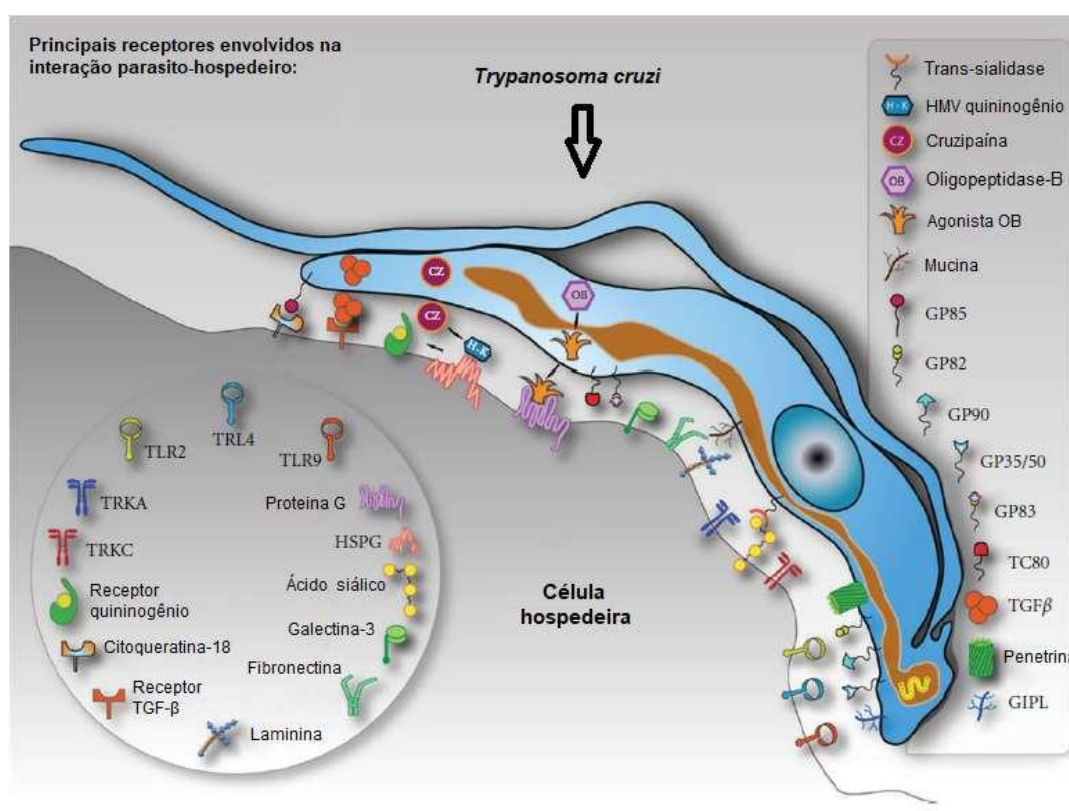


FIGURA 07- Receptores associados à adesão parasito-célula. Interação entre Parasito x Hospedeiro. Figura modificada de (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

1.5.4 A INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, possui vários mecanismos de escape imunológico que torna um obstáculo no descobrimento da cura para a doença (DENKERS; BUTCHER,

2005; LEIRIÃO; RODRIGUES; ALBUQUERQUE; MOTA, 2004). O processo inflamatório decorrente da infecção por Doença de Chagas, leva ao dano a órgãos vitais e a perda de sua funcionalidade (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004). A resposta imune adaptativa, tem seu papel crucial na resposta ao parasito e é necessária no controle tanto da fase aguda quanto na fase crônica da doença (GAZZINELLI; DENKERS, 2006). Após replicação nos tecidos do hospedeiro, o *Trypanosoma cruzi* induz a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que caracterizam um perfil de resposta contra a parasitemia. Uma das importantes citocinas que é produzida é a IL-12, que participa do controle inicial da infecção (ANTUNEZ; CARDONI, 2000). Esta citocina ativa células fagocitárias que destroem os parasitos internalizados pelo aumento da produção de reativos de nitrogênio e oxigênio (ROS) (GAZZINELLI; OSWALD; HIENY; JAMES *et al.*, 1992). O óxido nítrico (NO) possui efeito microbicida devido a produção de radicais livres tóxicos, gerados pela produção de NO que comprovadamente mata os parasitos *in vitro* (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). A citocina IL-10 e o fator de transformação do crescimento (TGF- β) possuem papel modulador da ativação da resposta imune contra diversos patógenos (GAZZINELLI; OSWALD; HIENY; JAMES *et al.*, 1992).

1.6 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA DE CHAGAS E METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO

Estudos experimentais relacionados à Doença de Chagas demonstraram uma forte resposta imunológica na fase aguda, com a presença de macrófagos ativados, produção de citocinas e outros mecanismos a fim de controlar a infecção e eliminar o parasito (TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). Um fato curioso observado na Doença de Chagas é o aumento da produção de organelas citoplasmáticas denominadas de corpúsculos lipídicos (CLs) produzidos pelos macrófagos infectados (D'AVILA; FREIRE-DE-LIMA; ROQUE; TEIXEIRA *et al.*, 2011; MELO; D'ÁVILA; FABRINO; ALMEIDA *et al.*, 2003).

Os CLs são organelas ricas em lipídeos que podem ser encontradas em células de todos os seres vivos desde bactérias a células de mamíferos (MURPHY, 2012). Essas organelas já foram visualizadas em diversos tipos de leucócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007) e podem estar envolvidas em inúmeras funções como produção de mediadores inflamatórios, tráfego de membrana, sinalização celular e metabolismo lipídico (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

A estrutura de um CL consiste basicamente em um núcleo de lipídeos neutros contendo triacilgliceróis (TAG) e éster de colesterol (CE) e envoltos por uma monocamada de fosfolipídeos (**FIGURA 08**) (TAUCHI-SATO; OZEKI; HOUJOU; TAGUCHI *et al.*, 2002).

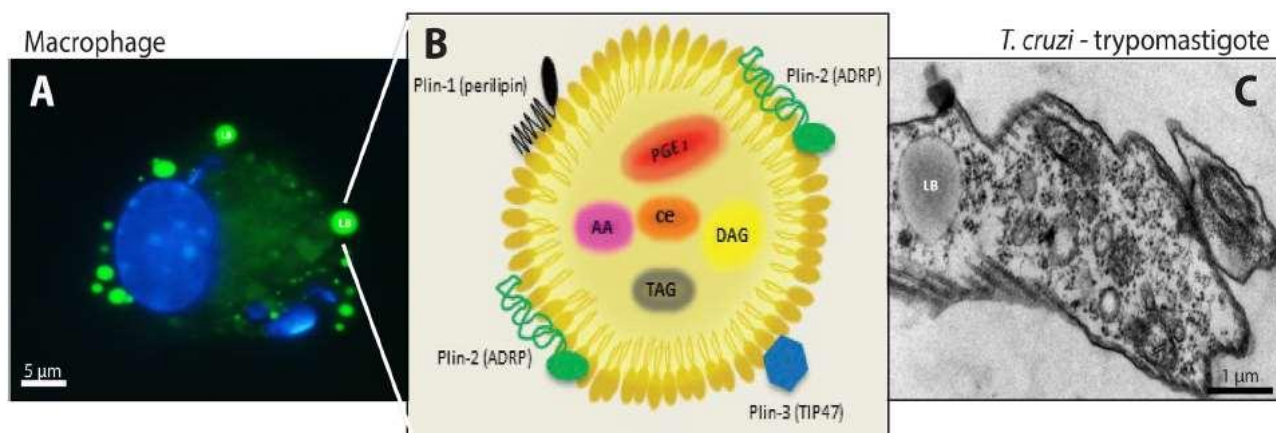


FIGURA 08 - Representação da estrutura de CLs por microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Em (A) vemos o acúmulo de CLs (em verde) corados por BODIPY R 493/503, em macrófago murino infectado com *T.cruzi*. O núcleo do macrófago e os parasitos internalizados foram corados por DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) em azul. Em (B) vemos uma representação esquemática da composição estrutural de um CL. Em cor, as proteínas de superfície do CL. Prostaglandina E2 (PGE) 2, ácido araquidônico (AA), diacilgliceróis (DAG), triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (CE) que são encontradas no núcleo lipídico neutro. Em (C) vemos uma micrografia eletrônica mostrando um CL na forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: (ALMEIDA; TOLEDO; RODRIGUES; D'AVILA, 2018).

Os CLs são organelas que se conectam com vários compartimentos celulares (VALM; COHEN; LEGANT; MELUNIS *et al.*, 2017). Existem várias proteínas descritas que estão presentes nos CLs, como as perilipinas (PLINs), enzimas biossintéticas de triacilglicerol (TAG), proteases transmembranares (FIT 1 e FIT 2) e SEIPINA, entre outras (TAN; SEOW; GOH; SILVER, 2014). Essas proteínas atuam coletivamente na membrana do retículo endoplasmático (RE) auxiliando na formação do CL. Os triacilgliceróis (TAG) são sintetizados e se acumulam no interior da bicamada lipídica na membrana do retículo, emergindo-se para a superfície do RE em direção ao citoplasma com auxílio da FIT 2 (**FIGURA 09**) (CHOUDHARY; GOLANI; JOSHI; COTTIER *et al.*, 2018; THIAM; BELLER, 2017). As enzimas denominadas de aciltransferases 1 e 2 (DGAT 1 e DGAT 2) participam do armazenamento do TAG (CHITRAJU; WALTHER; FARESE, 2019). As proteínas FIT representam um grupo de proteínas que tem como papel facilitar o brotamento dos CLs nas células (CHOUDHARY; OJHA; GOLDEN;

PRINZ, 2015; HAYES; CHOUDHARY; OJHA; SHIN *et al.*, 2017). Já a SEIPINA tem um papel na biogênese das gotículas e também são importantes para a manutenção do contato dos corpúsculos com o RE (GRIPPA; BUXO; MORA; FUNAYA *et al.*, 2015; SALO; BELEVICH; LI, 2016; SALO; LI; VIHINEN; HOLTITA-VUORI *et al.*, 2019). Outro papel da SEIPINA consiste em auxiliar o tráfego de lipídeos em direção às gotículas (SALO; LI; VIHINEN; HOLTITA-VUORI *et al.*, 2019). O brotamento do CL é determinado por uma tensão superficial local das membranas do RE (CHORLAY; MONTICELLI; VERISSIMO FERREIRA; BEN M'BAREK *et al.*, 2019; CHORLAY; THIAM, 2018)

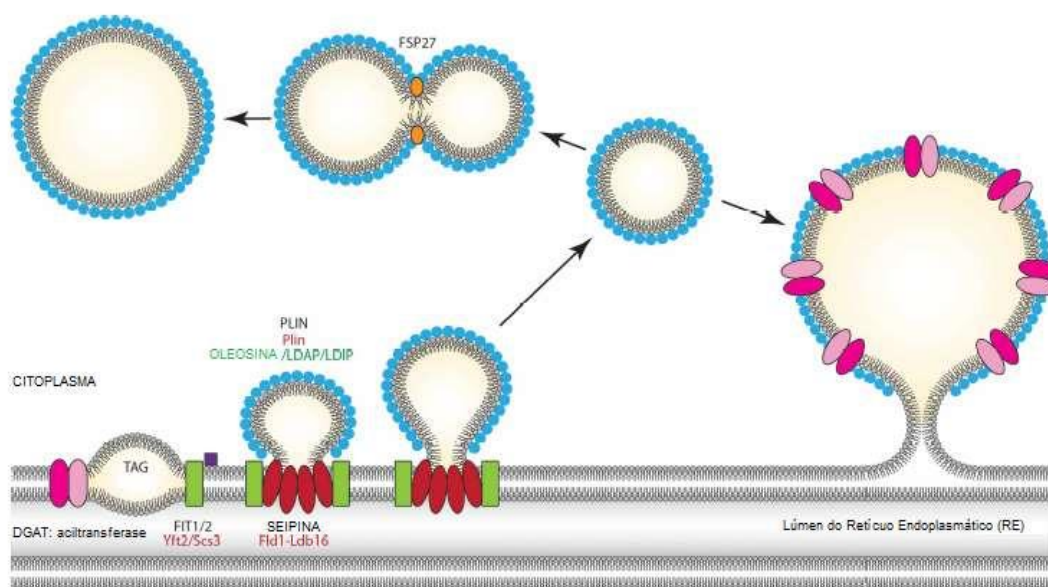


FIGURA 09 - Biogênese de um CL a partir da membrana do RE. Os corpúsculos lipídicos brotam da membrana do RE para a região citoplasmática da célula. Em colorido estão representadas algumas proteínas que participam da formação do corpúsculo até o brotamento: DGAT- aciltransferase, FIT 1/2, SEIPINA, proteínas PLIN e FSP27. Fonte: Adaptado de (PYC; CAI; GIDDA; YURCHENKO *et al.*, 2017).

Diversos estudos demonstraram o aumento expressivo do número e diâmetro dos CLs em macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi* e no próprio protozoário em contato com a célula hospedeira (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012; TOLEDO; ROQUE; TEIXEIRA; MILAN-GARCES *et al.*, 2016). Melo e cols, 2003 mostraram que durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* em ratas, houve uma intensa formação de CLs em macrófagos peritoneais, o que esteve correlacionada com a produção de PGE₂ (prostaglandinas) no sítio inflamatório (MELO; D'ÁVILA; FABRINO; ALMEIDA *et al.*, 2003). Os mediadores lipídicos tem potencial de inibir a resposta do linfócito T helper tipo 1 (TH1) modulando dessa forma o crescimento e a sobrevivência do parasito (KALINSKI, 2012). Diversos trabalhos vêm ressaltando que os CLs

favorecem a replicação do microrganismo, seja enfraquecendo a ação imunológica do hospedeiro, seja interagindo e fornecendo a matéria prima para produção das moléculas lipídicas do próprio parasito (VALLOCHI; TEIXEIRA; OLIVEIRA; MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2018) (FIGURA 10).

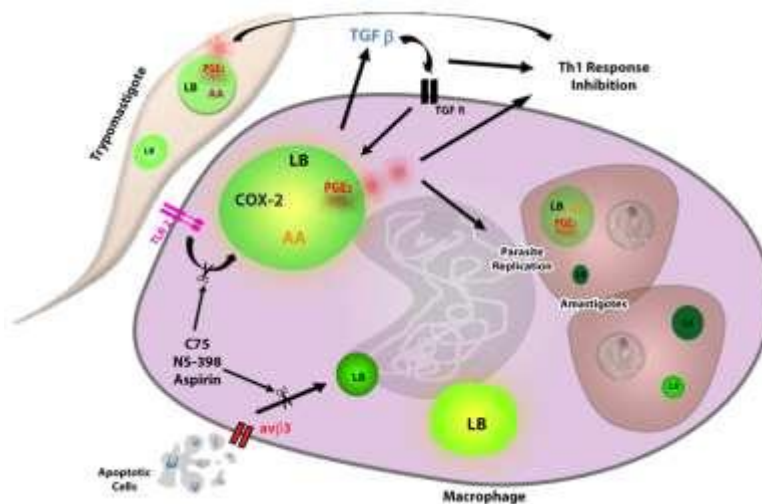


FIGURA 10 - Interação entre *Trypanosoma cruzi* e a célula hospedeira. A célula hospedeira produz mediadores derivados do ácido araquidônico como a prostaglandina (PGE₂) e Leucotrienos (LB) que são encontrados armazenados no interior dos CLs (estruturas em verde). Podemos também observar que após a interação da forma tripomastigote com o receptor TLR 2, há estímulo para a produção de CLs carregados de mediadores inflamatórios. Esses mediadores inibem a resposta TH 1 do sistema imune sendo responsável pela sobrevivência do protozoário na célula. Fonte: (ALMEIDA; TOLEDO; RODRIGUES; D'AVILA, 2018).

Assim neste trabalho, pretendemos elucidar o impacto das associações entre fatores solúveis produzidos por adipócitos maduros (FSA) na ativação de macrófaga durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Pretendemos estabelecer as relações da ativação dos macrófagos focando na modulação do metabolismo lipídico, na produção de mediadores inflamatórios e ativação de fatores transcricionais como o PPARy no curso da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

◇ Compreender o papel modulador dos fatores solúveis secretados pelos adipócitos (FSA) no processo de ativação macrofágica e metabolismo lipídico durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(I) Avaliar a biogênese de CLs em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* ou não, estimulados ou não com FSA;

(II) Analisar a síntese de citocinas e adipocinas em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* ou não, e estimulados ou não com FSA;

(III) Analisar a produção de NO (nitrito) em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* ou não, e estimulados ou não com FSA;

(IV) Avaliar a expressão de PPAR γ em macrófagos infectados com *Trypanosoma cruzi* ou não, e estimulados ou não com FSA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS NIH3T3-L1

A linhagem de pré-adipócitos murinos NIH3T3-L1 foram gentilmente cedidas pela Dra. Clarissa Maya Monteiro, do Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RJ. Para manter as células indiferenciadas (pré-adipócitos), utilizamos meio *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 4,5 g/L de glicose (*Invitrogen*) suplementado com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (*Gibco*) e 10% de soro bovino (*Invitrogen*). Os adipócitos foram contados e plaqueados (20 x 10³ células/ml) em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (*Invitrogen*), no qual foram mantidas por 4 dias. O processo de diferenciação foi então induzido pela adição de meio

DMEM 4,5 g/L de glicose suplementado com penicilina e estreptomicina, 10% soro fetal bovino, 1 μ M de dexametazona (*Sigma Aldrich*), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) (*Sigma Aldrich*) e 0,3 unidades/ml de insulina (*Humulin Regular – Lily*) por 3 dias. Acrescentamos meio DMEM 4,5 g/L de glicose contendo penicilina e estreptomicina, 10% de soro fetal bovino e 0,3 unidades de insulina/mL, substituindo 75% de seu volume total de 2 em 2 dias até o final da diferenciação. Desta forma, o dia -1 corresponde aos pré-adipócitos e os dias 3, 10 e 17, aos adipócitos progressivamente maduros (**FIGURA 11**) (Adaptado de Amaral, L. P. 2017, dissertação de mestrado).

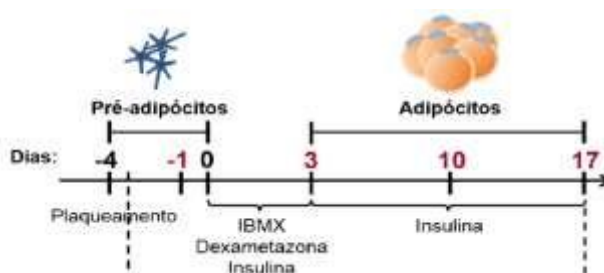


FIGURA 11- Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1. As células são submetidas ao meio de indução da diferenciação (IBMX, dexametazona, insulina) no dia 0. Após 3 dias são mantidas no meio de maturação (insulina) até o final da diferenciação (Adaptado de Amaral, L. P. 2017. Dissertação de mestrado).

Dois dias após o plaqueamento, verificou-se se as células atingiram confluência de 80-90%. O meio foi deixado sem trocar até o quarto dia.* No quarto dia foi adicionado o meio de indução da diferenciação (MID- DMEM high glucose, 10% soro fetal bovino, 1% Penicilina e estreptomicina, 1 μ M Dexametazona Sigma D4902, 0,5 mM IBMX Sigma I7810 e 0,3 unidades de insulina/mL Humulin Regular, Lily) e deixado por 4 dias. No oitavo dia, foi adicionado o meio de maturação (MM- DMEM high glucose, 10% soro fetal bovino, 1% Penicilina e estreptomicina, 0,3 unidades de insulina/mL) e a partir desse dia, trocado a cada 2 ou 3 dias, sempre mantendo 25% do meio antigo. A partir do 14º as células se encontraram bem diferenciadas com pico de diferenciação no 21º dia.

*Meio de manutenção dos adipócitos: DMEM high glucose, 10% soro fetal bovino, 1% Penicilina e estreptomicina.

3.2 - OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para obtenção dos macrófagos peritoneais, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos adultos com idade entre 6 a 8 semanas e aproximadamente 30 g. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF (protocolo 016/2016 CEUA/UFJF). Realizamos o lavado peritoneal injetando-se 4 mL de meio RPMI no peritônio dos animais eutanasiados, recolhendo todo o conteúdo em tubos falcons para posterior centrifugação (1500 rpm / 25°C / 5 min.). As células extraídas foram contabilizadas em câmara de Neubauer (tópico 3.3). Em seguida, os macrófagos foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, para contagem de Corpúsculos Lipídicos, dosagem de citocinas no sobrenadante (ELISA) e para recolhimento de lisados celulares das amostras para Western Blot. Para plaqueamento dessas células, utilizamos meio RPMI, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina. Após 2 horas os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI, 1% penicilina/estreptomicina e incubados por 16 horas, com RPMI, 2% soro fetal bovino e 1% antibiótico, até o estímulo dos macrófagos com sobrenadante de adipócitos e a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* cepa DM28C (MOI 3:1).

3.3 - CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEWBAUER

A suspensão celular contendo o lavado peritoneal foi submetida a contagem em câmara de Neubauer para realização do plaqueamento. A amostra foi diluída 40X em solução de Turk (Violeta de Genciana e Ácido Acético em proporção 1:100) e submetida à contagem, através dos 4 quadrantes da câmara de Neubauer.

3.4- ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS DIFERENCIADOS

No 17º dia de diferenciação adipogênica, os adipócitos foram mantidos por 24 horas em placas de cultura contendo RPMI 4,5 g/L de glicose 1% penicilina/estreptomicina, 2% de soro fetal bovino, até a realização do estímulo nos macrófagos peritoneais. Após as 24 horas completas, o sobrenadante dos adipócitos foi então coletado e centrifugado em 1500 rpm por 10 min, a 25°C. O estímulo foi feito adicionando-se sobrenadante nos poços correspondentes contendo macrófagos plaqueados e aguardando-se o tempo de 1 hora, para posterior infecção com *Trypanosoma cruzi*. Os poços que não receberam estímulo com sobrenadante foram mantidos em RPMI 4,5 g/L de glicose contendo 1% penicilina/estreptomicina, 2% de soro fetal bovino.

3.5 - OBTENÇÃO E CULTURA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

A Cultura do *Trypanosoma cruzi* (cepa DM28c) foi obtida e mantida em laboratório como descrito em (CONTRERAS; SALLES; THOMAS; MOREL *et al.*, 1985). As culturas de *Trypanosoma cruzi* foram crescidas e mantidas em Meio de Infusão de Coração e Cérebro suíno (Brain Heart Infusion Medium – BHI) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) à 27°C em uma estufa B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por 7 dias, contendo aproximadamente 100% de epimastigotas. No final da fase exponencial de crescimento, os parasitos foram centrifugados à 2200 rpm por 15 minutos à 10°C, ressuspendidos em meio que simula a Urina Artificial de Triatomínio (TAU) (NaCl 190 mM, tampão fosfato 8 Mm pH 6.0, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM), e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Os parasitas foram diluídos para concentração final de $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ em TAU suplementado com bicarbonato de sódio 1,4%, 2,5% (v/v), 500 unidades de penicilina (mL^{-1}), 10 mM de L-prolina (meio TAU-P) e incubados à 27°C em garrafas de cultura na incubadora B.O.D por 5 dias, obtendo assim aproximadamente 100% de tripomastigotas metacíclicos (CONTRERAS *et al.*, 1985).

3.6 - INFECÇÃO COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Após 1 hora de estímulo dos macrófagos peritoneais com sobrenadante de adipócitos, foi feita a infecção com *Trypanosoma cruzi*. As células foram infectadas, mantendo-se o sobrenadante dos adipócitos ou meio RPMI, com MOI 3:1 de *Trypanosoma cruzi* da cepa DM28C obtidos como descrito acima. Após 24 horas, os poços foram lavados com RPMI 1% penicilina/estreptomicina e sobrenadante de adipócitos ou RPMI 1% penicilina/estreptomicina, 2% SFB, foi novamente adicionado, incubando-se as placas durante 24, 48 e 72 horas para coleta das amostras do sobrenadante para dosagem de citocinas, adipocinas e NO. Foi realizada a fixação das células nas lamínulas para posterior coloração com Oil Red O e DAPI para contagem de CLs. As células cultivadas em placas de 6 poços, foram lisadas para obtenção de proteínas totais para realização do Western Blot.

3.7 - COLORAÇÃO COM OIL RED O E CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

As lâminulas foram fixadas em formalina 3,7% por 24 horas e logo depois, seguiu-se a coloração com Oil-Red-O. A solução estoque de OilRed O (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3%

(0,3 g de OilRed O/100 mL de isopropanol (ácido isopropílico) (Sigma Aldrich)), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente. No dia da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Concluída a diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de CLs, na própria placa de cultura. A solução de formalina 3,7% foi retirada e os poços foram lavados com água destilada. Em seguida, foram adicionados 300 µl da solução de uso de Oilred O, e incubando por 5 minutos, no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequência 2 vezes com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mountingmediumcontaining DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células. Os CLs foram contados em 50 células consecutivas após análise em microscópio de fluorescência BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan).

3.8 – AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram capturadas a partir das lâminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa quanto á biogênese de corpúsculos lipídicos e morfologia celular dos macrófagos, pré-adipócitos e adipócitos. As imagens foram processadas por meio do programa CellSens Dimension, em microscópio de fluorescência Olympus DP73, no aumento de 20x ou 100x.

3.9 - WESTERN BLOT

Para obter o lisado celular utilizamos 70 µL de tampão de amostra (Trizma base 3g, água Milli Q 40 mL, glicerol 40 mL, SDS 8g, β-Mercapto Etanol 20 mL, Azul de Bromofenil 250 µL), após lavagem com PBS estéril e fervido em seguida a 90°C por 5 minutos. As proteínas totais foram posteriormente submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (50 µL de amostra em gradiente de acrilamida 10%, 125 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose umedecida em tampão de transferência (100 mL de 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8 quando dissolvidos em 80 mL de H₂O MiliQ e 20 mL de metanol). A transferência foi feita a 90 Volts, por 2 horas. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h ou por 16 h com solução bloqueadora de leite 5% em TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mMNaCl, 0.05 % Tween 20). Após essa etapa, a membrana foi lavada com TBST, e incubada por 16 h com o anticorpo primário anti-PPAR (clone H100, ou clone E8 Santa Cruz Biotechnology) diluição 1:400. Utilizamos um anticorpo monoclonal anti-β-actina (BD

Transduction Laboratories) na concentração de 1:5.000 para controle positivo experimental. Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBST, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo (Pierce), conjugado a peroxidase (HRP) diluídos na hora do uso na concentração de 1:20.000 anti-coelho ou 1:15.000 anti-camundongo. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBST. A detecção foi feita com o sistema de análise de “Western blotting “Super signal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (Amersham Hyperfilm ECL – High performance chemiluminescence film) GE Health care Limited.

3.10 - DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-10 e TNF- α e adipocinas leptina e adiponectina foram detectadas no sobrenadante dos macrófagos e no sobrenadante dos adipócitos (“*Input*”) foram dosados pela técnica de ELISA segundo o protocolo oferecido pela fabricante (R&D Systems). A quantificação foi mensurada a partir das curvas padrão proveniente da diluição realizada. A leitura foi realizada em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro.

3.11 - DOSAGEM DE NITRITO

O sobrenadante dos macrófagos peritoneiais, estimulados com sobrenadante de adipócitos, ou não, e infectados com *M. bovis*, ou não, foi recolhido e o óxido nítrico determinado de forma indireta por meio da conversão de nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻), pela ação da enzima nitrato-reductase e o nitrito quantificado pela reação de Griess. Para a reação de Griess adicionou-se a 100 μ L de sobrenadante, 100 μ L do reagente de Griess (Sulfonilamida em H₃PO₄ 5%/ N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato em água destilada) e após 10 minutos a absorbância foi lida em leitor de microplaca a 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrato de sódio (500 a 8,7 ng/mL) e expressos em μ M de NO₂⁻.

3.12 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) segundo ANOVA seguido pelo teste *t* de Student, com significância de $p < 0.05$ Os gráficos foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism®7(GraphPad Software).

4- RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA BIOGÊNESE DE CLs EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO POR *Trypanosoma cruzi*, ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS (FSA):

Avaliamos a formação de CLs em macrófagos peritoneais estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos diferenciados e infectados ou não com *Trypanosoma cruzi* (MOI 3:1) nos tempos de 24, 48 e 72 h (Figura 12, 13, 14). Observamos que FSA induziu aumento na biogênese de CLs e esse aumento foi potencializado na presença da infecção.

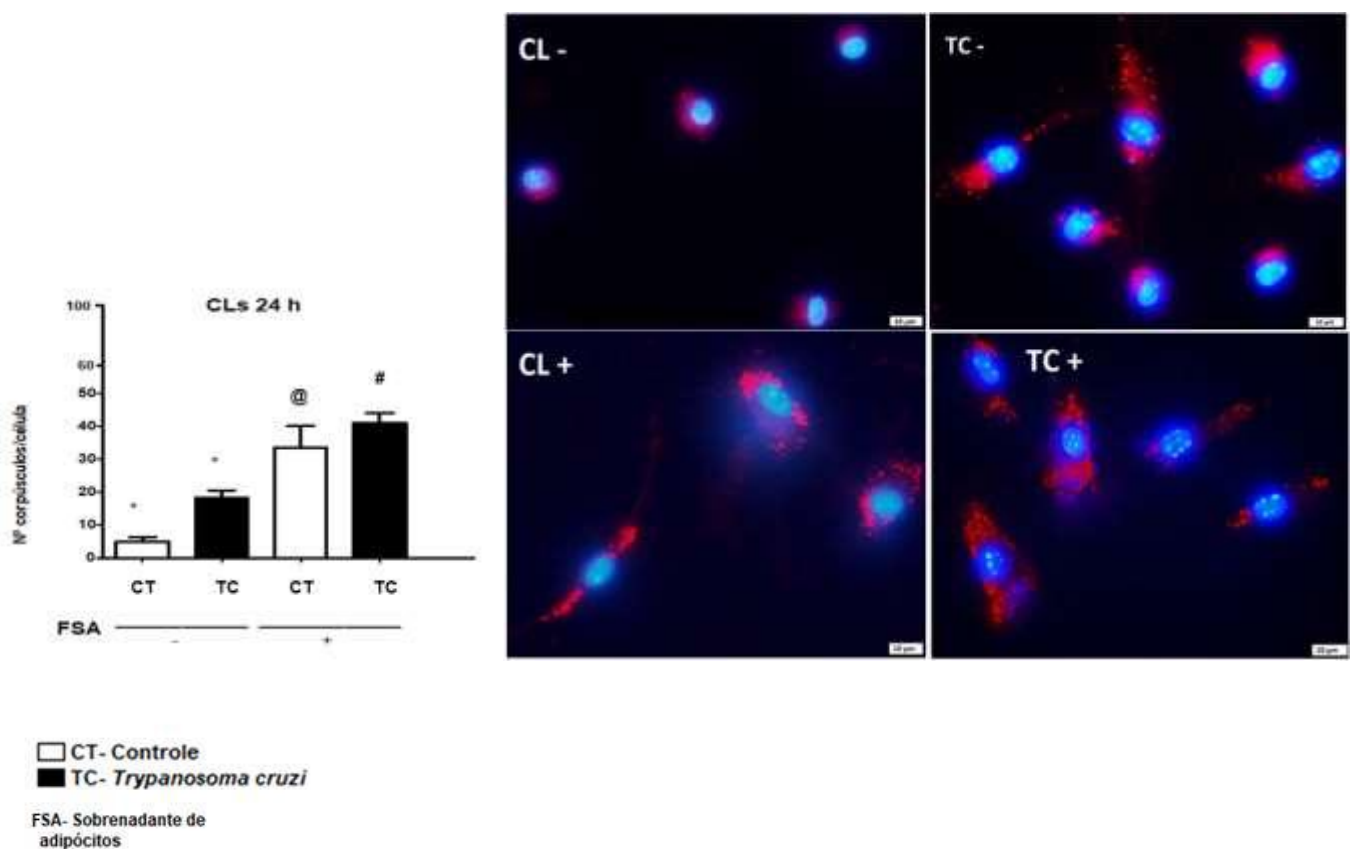


FIGURA12 - Biogênese de CLs em macrófagos infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 24 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (*) Indica diferença significativa do grupo infectado (TC -) em relação ao grupo controle (CT -). (@) Indica uma diferença significativa entre o grupo (CT+) e (CT-). (#) Indica uma diferença significativa entre o grupo (TC+) e (TC-). As colunas representam a média \pm erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. As imagens foram obtidas por microscópio de

fluorescência e a análise da formação de CLs foi feita após coloração com OilRed O, contra-coloração do núcleo com DAPI, aumento de 100X.

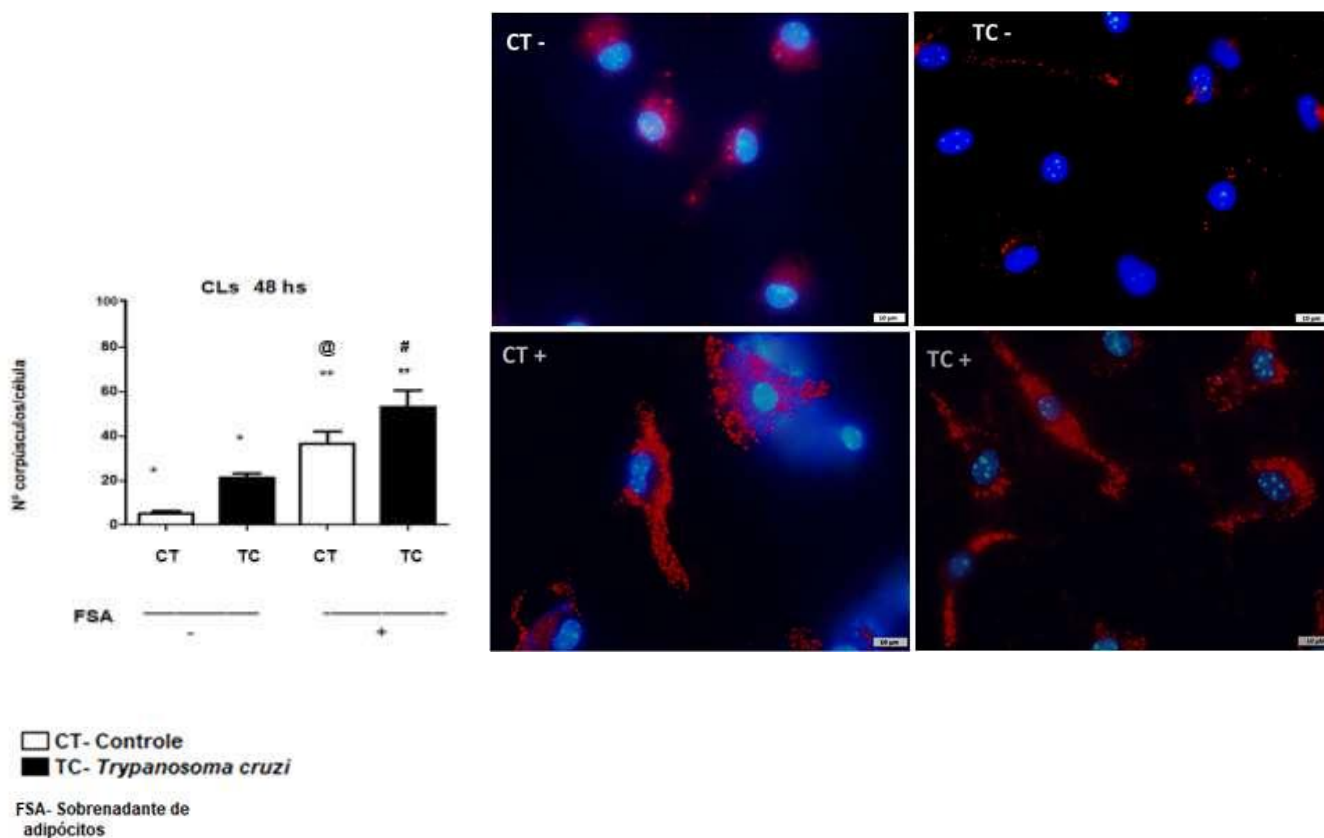


FIGURA 13 - Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 48 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (*) Indica diferença significativa do grupo infectado (TC -) em relação ao grupo controle (CT -). (**) Indica diferença significativa entre o grupo infectado (TC+) e o grupo controle (CT+). (@) Indica uma diferença significativa entre o grupo (CT+) e (CT-). (#) Indica uma diferença significativa entre o grupo (TC+) e (TC-). As colunas representam a média \pm erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de CLs foi feita após coloração com OilRed O, contra-coloração do núcleo com DAPI, aumento de 100X.

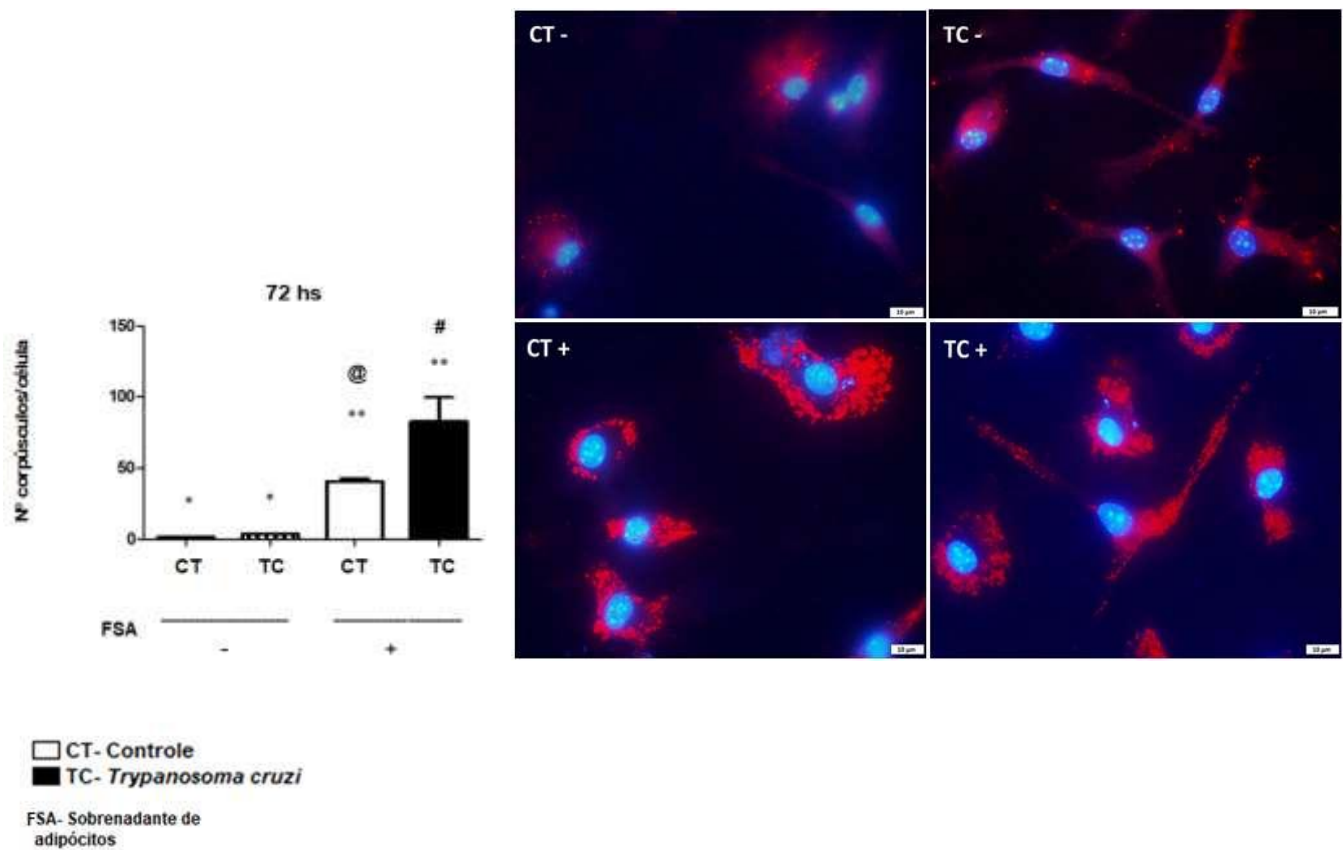


FIGURA14 - Biogênese de CLs em macrófagos infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-) após 72 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (*) Indica diferença significativa do grupo infectado (TC -) em relação ao grupo controle (CT -). (**) Indica diferença significativa entre o grupo infectado (TC+) e o grupo controle (CT+). (@) Indica uma diferença significativa entre o grupo (CT+) e (CT-). (#) Indica uma diferença significativa entre o grupo (TC+) e (TC-). As colunas representam a média \pm erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de CLs foi feita após coloração com OilRed O, contra-coloração do núcleo com DAPI, aumento de 100X.

4.2 - ANÁLISE DAS CITOCINAS IL-10, TNF α KC EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *Trypanosoma cruzi*, por 24, 48 e 72 h.

Avaliamos a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 no sobrenadante dos macrófagos peritoneais estimulados, ou não, e infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*. A produção de IL-10 foi observada nos tempos de 24, 48 e 72 h nos macrófagos controles. De modo interessante o FSA foi capaz de induzir o aumento na produção dessa citocina nos macrófagos mesmo sem infecção. Além disso, observamos uma redução significativa da produção de IL-10 nos macrófagos estimulados e infectados por *Trypanosoma cruzi* nos três tempos analisados. Nossos dados indicam que a infecção por *Trypanosoma cruzi*, parece modular negativamente a produção de IL-10 induzida por FSA nos três tempos analisados.

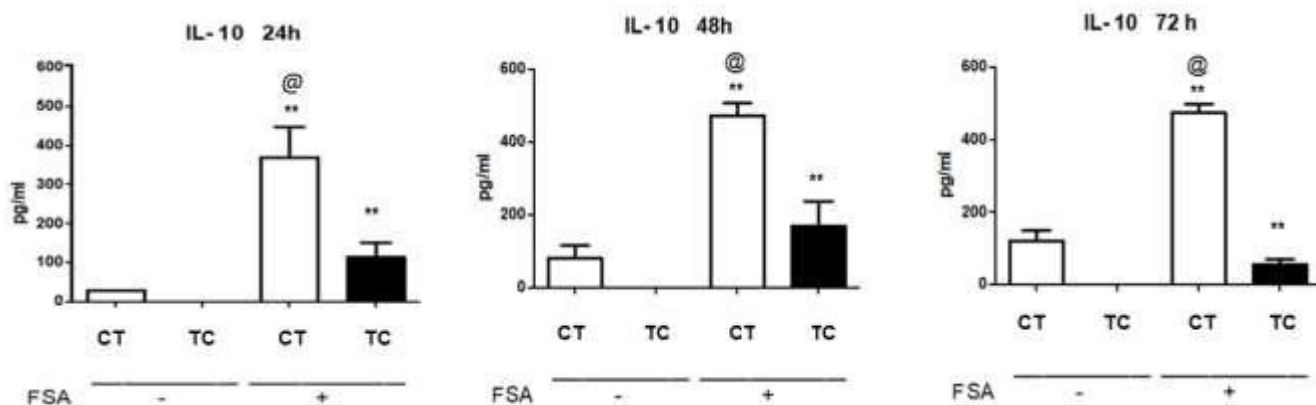


FIGURA 15 – Quantificação de IL-10 em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (**) Indica diferença significativa entre o grupo infectado (TC+) e o grupo controle (CT+). (@) Indica uma diferença significativa entre o grupo (CT+) e (CT-). As colunas representam a média \pm erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

Avaliamos também a produção da citocina pró-inflamatória TNF α no sobrenadante dos macrófagos peritoneais nos grupos estimulados com sobrenadante de adipócitos, ou não, e infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*. A produção de TNF α foi observada nos tempos de 24, 48 e 72 h, após a infecção. Entretanto apenas nos tempos de 24 e 48 h esse aumento se mostrou significativo em relação aos macrófagos não infectados. Além disso, FSA parece não

modular a produção de TNF α por macrófagos peritoneais nos tempos analisados, bem como a infecção também não interferiu no aumento dessa citocina na presença de FSA quando comparados aos macrófagos sem a presença de FSA.

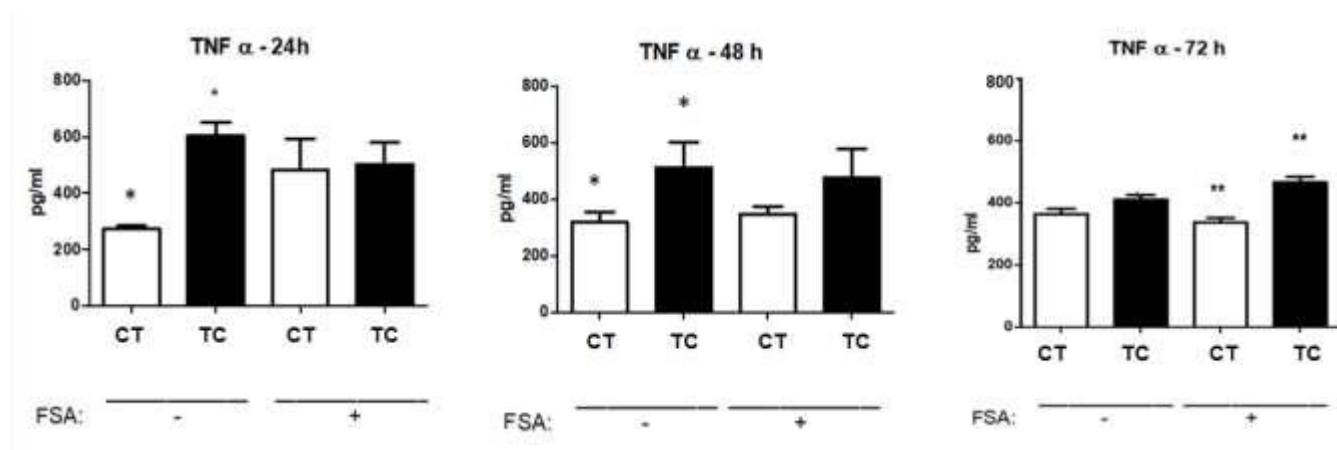


FIGURA 16 – Quantificação de TNF α em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (*) Indica diferença significativa do grupo infectado (TC -) em relação ao grupo controle (CT -). (**) Indica diferença significativa entre o grupo infectado (TC+) e o grupo controle (CT+). As colunas representam a média \pm erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

Avaliamos a produção de KC no sobrenadante de macrófagos peritoneais nos grupos estimulados com sobrenadante de adipócitos, ou não, e infectados com *Trypanosoma cruzi*, ou não. A produção de KC foi observada nos tempos de 24, 48 e 72 h. Observamos uma diferença significativa no tempo de 24 h e 48 h entre o grupo controle (CT-) e infectado (TC -) sem o estímulo com o sobrenadante. Além disso, observamos que FSA foi capaz de potencializar a produção de KC apenas no tempo de 24 h.

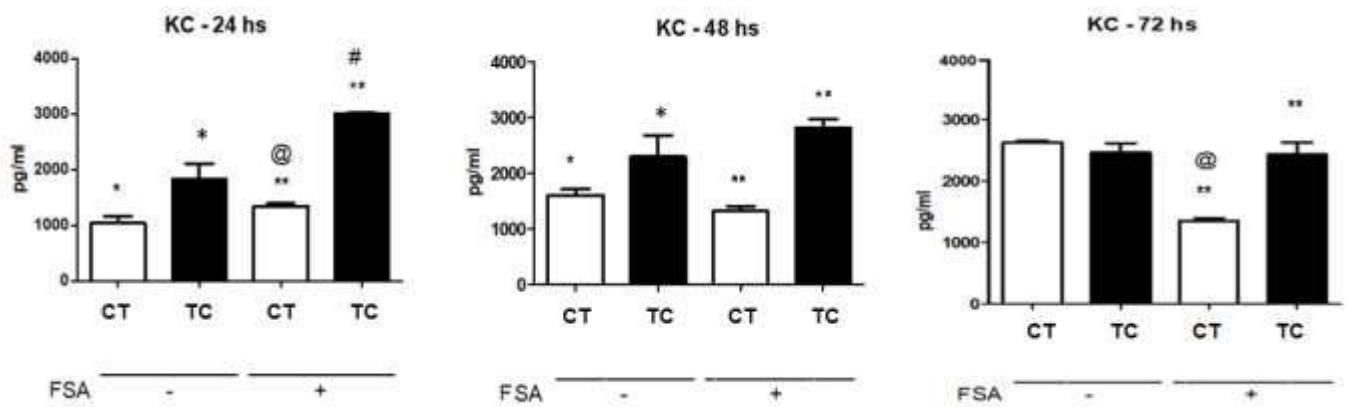
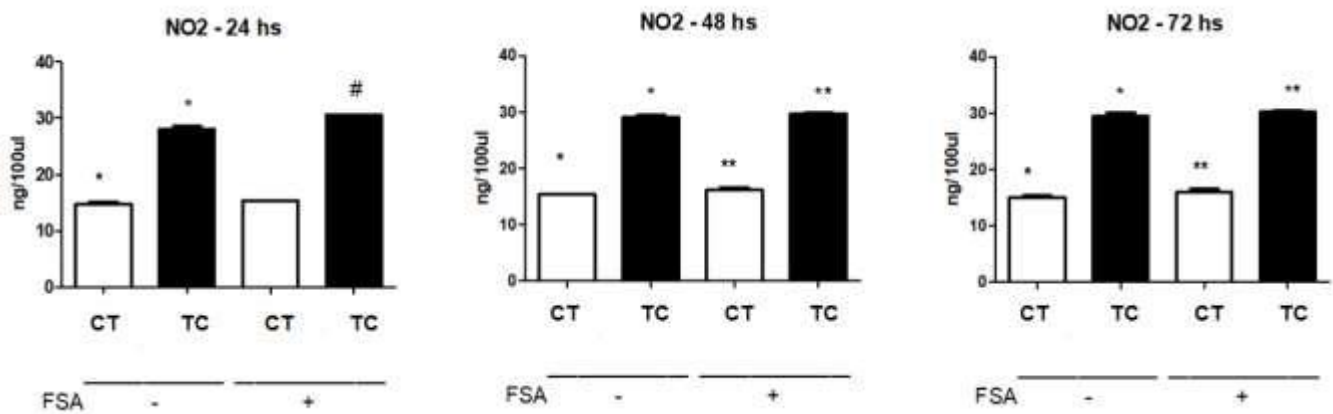


FIGURA 17 – Quantificação de KC em macrófagos coletados 24, 48 e 72 h. O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (*) Indica diferença significativa do grupo infectado (TC -) em relação ao grupo controle (CT -). (**) Indica diferença significativa entre o grupo infectado (TC+) e o grupo controle (CT+). (@) Indica uma diferença significativa entre o grupo (CT+) e (CT-). (#) Indica uma diferença significativa entre o grupo (TC+) e (TC-). As colunas representam a média ± erro padrão de três experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$.

4.3 –ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Trypanosoma cruzi*, ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS 24, 48 e 72 h

A produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais foi avaliada por detecção indireta de nitrito. A produção de NO foi observada nos tempos de infecção 24, 48 e 72 h. Observamos uma diferença significativa entre o grupo controle e infectado nos três tempos. Esses dados reforçam a teoria de que os macrófagos infectados produzem NO, um gás solúvel e potente microbicida. Além disso, observamos que FSA foi capaz de potencializar a produção de NO apenas no tempo de 24 h.



4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PPAR γ EM MACRÓFAGOS INFECTADOS OU NÃO COM *Trypanosoma cruzi*, ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS:

A expressão do receptor nuclear PPAR γ foi analisada utilizando a técnica de Western Blot nos tempos de 21, 48 e 72 h em grupos infectados ou não, estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos. Os resultados mostraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* induziu a expressão de PPAR γ em relação aos grupos não infectados. Além disso, os resultados parece sugerir que FSA induz a expressão de PPAR γ no tempo de 72h no qual é potencializada na presença da infecção.

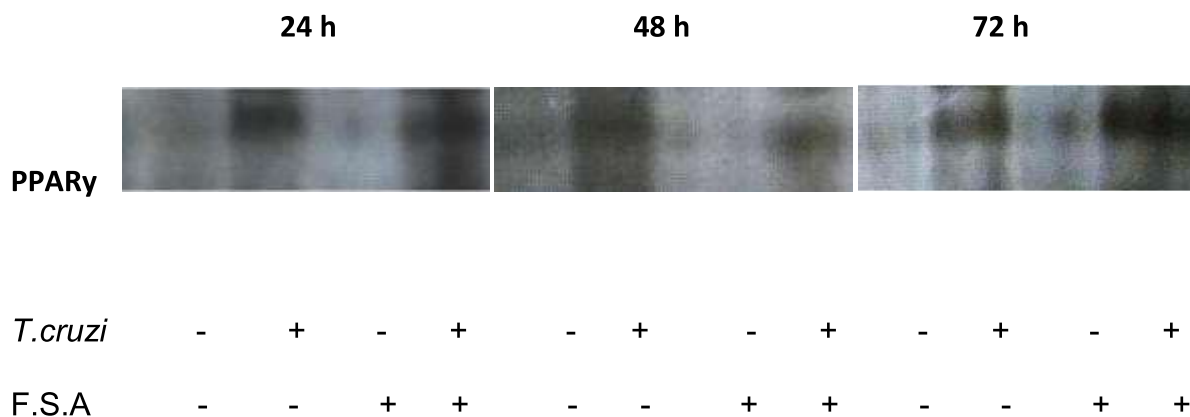


FIGURA 19 - Expressão de PPAR γ : Macrófagos foram estimulados com sobrenadante de adipócitos (FSA +) ou não (FSA -) e infectados com *Trypanosoma cruzi* MOI 3:1 (TC +) ou não (TC -), durante 24, 48 e 72 horas.

5. DISCUSSÃO

Atualmente o sobrepeso e a obesidade se tornou um grave problema de saúde mundial atingindo cerca de 70 países (AFSHIN; FOROUZANFAR; REITSMA; SUR *et al.*, 2017) e representa um sério fator de risco para o surgimento de inúmeras doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e até câncer (WHO, 2018). Além disso, a obesidade estimula um estado inflamatório crônico e hiperglicemia que contribuem para o surgimento da SM (DASHTY, 2013; MASTROCOLA; ARAGNO; ALLOATTI; COLLINO *et al.*, 2018). Visto que a obesidade é determinada pela quantidade de massa de TA (GREENBERG; OBIN, 2006), esse tecido é capaz de secretar inúmeras proteínas e citocinas que apresentam funções de influenciar a atividade metabólica de vários órgãos através de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2003; GIMENO; KLAMAN, 2005; MATSUZAWA, 2006; SCHERER, 2006). Dessa forma, o desequilíbrio ou disfunção do TA resulta em patologias associadas à SM (GIMENO; KLAMAN, 2005; MATSUZAWA, 2006). Durante o processo de obesidade, o TA se apresenta com certo grau de inflamação denominado de metainflamação, além de apresentar também certo grau de expansão, o que gera adipócitos hipertróficos, aumento de influxo de células imunes para a região e ativação do inflamassoma (HARTE; TRIPATHI; PIYA; BARBER *et al.*, 2013; WEISBERG; MCCANN; DESAI;

ROSENBAUM *et al.*, 2003). Uma disfunção adiposa induz os adipócitos a secretarem inúmeros mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, PCR, fibrinogênio, leptina, MCP-1, resistina, entre outras (BARCHETTA; CIMINI; CICCARELLI; BARONI, 2019). Além dessa série de moléculas, outros fatores também podem interferir no metabolismo e sinalização entre células como é o caso das vesículas extracelulares (VEs), que incluem microvesículas, micropartículas e também exossomos (KRANENDONK; VISSEREN; VAN BALKOM; NOLTE-'T HOEN *et al.*, 2014; THERY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). O papel das VEs no imunometabolismo do tecido adiposo já foi descrito em modelos murinos (DENG; POLIAKOV; HARDY; CLEMENTS *et al.*, 2009) mas o seu papel na sinalização parácrina na inflamação do TA ainda não está bem compreendida (KRANENDONK; VISSEREN; VAN BALKOM; NOLTE-'T HOEN *et al.*, 2014). Porém sabe-se que vesículas extracelulares isoladas de adipócitos têm a capacidade de induzir monócitos a se diferenciarem em macrófagos, além de estarem relacionadas com surgimento de resistência insulínica local e entre outras funções imunomoduladoras (KRANENDONK; VISSEREN; VAN BALKOM; NOLTE-'T HOEN *et al.*, 2014). Isso acontece devido ao processo de inflamação induzida nos macrófagos diminuir à sinalização da insulina nos adipócitos (OLEFSKY; GLASS, 2010; SOLINAS; VILCU; NEELS; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2007). Protozoários como o *Trypanosoma cruzi*, modelo do nosso estudo, também podem secretar VEs que também desempenham papel de comunicação celular e modulação da resposta imune ao parasito (MARCILLA; MARTIN-JAULAR; TRELIS; DE MENEZES-NETO *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que a inoculação dessas vesículas em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, contribuiu para aumentar a mortalidade desses animais, mostrando assim um relevante papel modulador na patogênese da Doença de Chagas (TROCOLI TORRECILHAS; TONELLI; PAVANELLI; DA SILVA *et al.*, 2009). Porém as vias de transcrição utilizadas pelo *Trypanosoma cruzi* na secreção de vesículas durante a infecção macrofágica ainda não é bem conhecida. Trabalho de Lovo-Martins *et al.*, 2018 demonstrou que as vesículas secretadas pelo *Trypanosoma cruzi* também possuem um papel de potencializar a infecção em macrófagos murinos, aumentando a produção de CLs e mediadores inflamatórios como prostaglandinas, além de aumentar a parasitemia cardíaca (LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018). Outro dado curioso, desse mesmo trabalho, demonstrou que macrófagos estimulados com tais vesículas tiveram a infecção pelo parasito aumentada, além do aumento também da liberação das formas tripomastigotas pelas células infectadas e diminuição da produção de nitritos pelas mesmas, mais uma vez evidentes o papel modulador das vesículas durante a infecção (LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018). Acredita-se que o aumento dessa parasitemia deve-se ao fato do *Trypanosoma cruzi* utilizar vesículas para secretar fatores

envolvidos na adesão do parasita às células do hospedeiro e na invasão da célula hospedeira, além de atuar na evasão do sistema imune do hospedeiro (TROCOLI TORRECILHAS; TONELLI; PAVANELLI; DA SILVA *et al.*, 2009).

Como as relações entre obesidade, doenças inflamatórias, infecciosas e o sistema imune são pouco compreendidos, nosso trabalho buscou elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa interação. Diversos estudos demonstraram o papel da parasitemia no estímulo da produção de CLs, mediadores inflamatórios e citocinas mas nenhum deles verificou o papel do FSA na produção dessas moléculas pelo macrófago e na modulação do metabolismo lipídico. Por isso, nosso trabalho buscou entender o papel de FSA na ativação de macrófagos, processos da resposta inflamatória e metabolismo lipídico durante a patogênese causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi in vitro*.

Inicialmente buscamos o estabelecimento do protocolo de diferenciação celular adipogênica, utilizando para isso a linhagem de pré-adipócitos NIH3T3-L1. Essa linhagem celular faz parte do modelo de estudo do processo de adipogênese mais bem caracterizado e vários trabalhos têm sido desenvolvidos com base nele (FAZOLINI; CRUZ; WERNECK; VIOLA *et al.*, 2015; JEFFERY; CHURCH; HOLTRUP; COLMAN *et al.*, 2015; LI; NING; MA; JIN *et al.*, 2017; MAYA-MONTEIRO; BOZZA, 2008; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000).

Um dado interessante observado na Doença de Chagas e algumas outras patologias é o aumento da produção de CLs produzidos pelos macrófagos infectados (D'AVILA; FREIRE-DE-LIMA; ROQUE; TEIXEIRA *et al.*, 2011; MELO; D'ÁVILA; FABRINO; ALMEIDA *et al.*, 2003). Vários estudos vem relatando que os CLs estão relacionados a um processo inflamatório onde a partir da presença de diferentes estímulos inflamatórios e/ou infecciosos, há um aumento em número e tamanho dessas organelas (ALMEIDA; TOLEDO; RODRIGUES; D'AVILA, 2018; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2005; BOZZA; MAGALHAES; WELLER, 2009). Macrófagos que acumulam grandes quantidades de CLs (chamados macrófagos espumosos) têm sido caracterizados durante infecções micobacterianas (CARDONA; LLATJOS; GORDILLO; DIAZ *et al.*, 2000), no caso de bactérias como *M. Bovis* BCG (ALMEIDA; ROQUE; MAGALHAES; MATTOS *et al.*, 2014; ALMEIDA; SILVA; MAYA-MONTEIRO; TOROCSIK *et al.*, 2009; D'AVILA; MAYA-MONTEIRO; BOZZA, 2008) e por *Mycobacterium leprae* (MATTOS; SARNO; PESSOLANI; BOZZA, 2012), funcionando como nichos de sobrevivência para o microrganismo invasor.

Nesse trabalho, analisamos a formação de CLs por macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com *Trypanosoma cruzi*, em três tempos diferentes de estímulo e infecção, 24, 48 e 72 horas. Verificamos um aumento do número de CLs nos grupos infectados nos três tempos diferentes, confirmando que a infecção

parasitêmica estimula a biogênese de corpúsculos nos macrófagos infectados, como já relatado em trabalhos anteriores. Além disso, verificamos que os FSA induziu aumento na produção de CLs, sendo que esse aumento foi potencializado pela infecção nos três tempos de estudo (**FIGURAS 12, 13 e 14**).

Embora existam muitos trabalhos referentes à adipócitos e citocinas, a maioria deles concentrou-se em abordar um número restrito de citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a resistina (VONA-DAVIS; ROSE, 2007). Um estudo anterior demonstrou que regulação de citocinas inflamatórias como TNF- α e MCP-1 podem ser desencadeadas pela co-cultura de adipócitos diferenciados a partir da linhagem NIH3T3-L1 e macrófagos da linhagem RAW264 (SUGANAMI; TANIMOTO-KOYAMA; NISHIDA; ITOH *et al.*, 2007). Tais alterações inflamatórias são induzidas em co-cultura ocorrem sem contato entre as células, sugerindo o papel de fatores solúveis (SUGANAMI; TANIMOTO-KOYAMA; NISHIDA; ITOH *et al.*, 2007). A exemplo desse mecanismo observa-se em macrófagos co-cultivados com adipócitos e estimulados com LPS, passam a produzir níveis mais elevados de IL-6, bem como de MCP-1 (YAMASHITA; SOGA; IWAMOTO; ASANO *et al.*, 2008). Esses dados corroboram com a hipótese de que o TA pode desempenhar um papel importante na amplificação da resposta inflamatória e metabolismo lipídico desempenhando um papel fundamental no curso e desenvolvimento de processos infecciosos.

Analisamos nesse trabalho, a produção de citocinas tanto de perfil anti-inflamatório como IL-10, quanto de perfil pró-inflamatório como TNF α e KC e também a produção de óxido nítrico (NO) e PPAR γ .

Aqui, nós avaliamos os níveis de IL-10, uma citocina que possui efeitos imunoregulatórios sobre macrófagos e sobre a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Essa citocina é capaz também de inibir a proliferação de células Th1 e favorecer o desenvolvimento de respostas Th2 (ALVARADO-VAZQUEZ; BERNAL; PAIGE; GROSICK *et al.*, 2017; XUE; QIU; YANG, 2017). Estudos mostraram uma maior predominância de IL-10 em indivíduos na fase assintomática da Doença de Chagas do que nos indivíduos que apresentam cardiomiopatia (SILVA; GATTO; TEODORO; GOLIM *et al.*, 2016). Conforme alguns estudos, a produção de IL-10 torna-se necessária para atenuar o processo inflamatório em indivíduos que apresentam infecção aguda por Doença de Chagas, possibilitando reduzir os riscos de mortalidade precoce (NOVAES; GONÇALVES; PENITENTE; BOZI *et al.*, 2016; ROFFE; ROTHFUCHS; SANTIAGO; MARINO *et al.*, 2012). Já em indivíduos obesos, tanto a IL-10 quanto a adiponectina se encontram curiosamente reduzidas (STEFAN; STUMVOLL, 2002). Neste estudo demonstramos que a produção de IL-10 foi inibida pela infecção por *Trypanosoma cruzi* nos três tempos analisados. Além disso, FSA foi capaz de induzir a

produção desta citocina nos grupos controles nos três tempos 24, 48 e 72 h (**FIGURA 15**). Este efeito foi negativamente modulado pela infecção também nos três tempos, sugerindo um papel modulador da infecção por este parasito na célula hospedeira.

O TNF- α , é uma citocina de natureza pró-inflamatória e desempenha um papel fundamental na regulação da resposta inflamatória, proliferação celular, diferenciação celular e apoptose (GAUR; AGGARWAL, 2003). Possui o papel de ativar e recrutar neutrófilos e monócitos para o local da infecção (NOURIAN; CHALESHI; PISHKAR; AZIMZADEH *et al.*, 2017; SHEN; ZHOU; ZHOU; ZHOU *et al.*, 2017; XU; WANG, 2017). Estudos realizados com culturas de células cardíacas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* verificou a liberação dessa citocina pelas células em resposta à infecção, além do aumento também de interleucina 1 beta (IL-1 β) e iNOS e de algumas quimiocinas (MACHADO; MARTINS; ALIBERTI; MESTRINER *et al.*, 2000). Diversos estudos demonstraram que a infecção por *Trypanosoma cruzi* induz uma forte resposta anti-parasitária com produção de uma série de citocinas IL-1 β e TNF- α , além de óxido nítrico (NO) enquanto que as citocinas TGF- β e IL-10 promove a modulação da reação inflamatória ocasionando suscetibilidade (SILVA; ALIBERTI; MARTINS; SOUZA *et al.*, 1998). Um outro estudo verificou que com 30 dias pós-infecção, os camundongos tiveram perda lipídica em seus tecidos, além de um aumento da infiltração de macrófagos, TNF α , interferon gama (IFN γ) e IL-1 β no local enquanto que o TA contribuiu o para aumento da IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e resistina (COMBS; NAGAJYOTHI; MUKHERJEE; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Corroborando com os dados desse estudo, observamos que a infecção por *T. cruzi* induziu um aumento da produção da citocina TNF α em relação aos grupos controles nos tempos de 24 e 48 h. Observamos ainda que a produção dessa citocina não foi modulada pelo FSA em nenhum dos tempos analisados (**FIGURA 16**).

Avaliamos também a produção da citocina KC nos três tempos diferentes de infecção. KC é uma quimiocina que tem como função recrutar neutrófilos para os locais de infecção e se liga ao seu receptor CXCR2 (LEE; CACALANO; CAMERATO; TOY *et al.*, 1995). Essa citocina é produzida por macrófagos residentes através da via de ativação MyD88 e ocorre por sinalização proveniente da estimulação do receptor toll (TLR) (DE FILIPPO; HENDERSON; LASCHINGER; HOGG, 2008). Esse mesmo estudo demonstrou que a estimulação de macrófagos com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) induz um aumento na produção de KC simultaneamente com aumento de neutrófilos para a região do antígeno (DE FILIPPO; HENDERSON; LASCHINGER; HOGG, 2008). Na avaliação da citocina KC, observamos que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* estimulou um aumento da produção de KC nos tempos de 24 e 48 h, porém a produção da citocina foi modulada pelo FSA somente no tempo de 24h (**FIGURA 17**).

Estudos também mostraram que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* correlaciona-se com a lipólise e perda de conteúdo lipídico no tecido adiposo em camundongos infectados (NAGAJYOTHI; WEISS, 2019) e que o aumento da beta-oxidação de ácidos graxos contribui para a elevação dos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) (RAJALA; SCHERER, 2003). O macrófago ativado regula a produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (INOS), importante molécula microbicida que contribui para a destruição do parasito no interior da célula (KNUBEL; INSFRAN; MARTINEZ; DIAZ LUJAN *et al.*, 2017; KNUBEL; MARTINEZ; ACOSTA RODRIGUEZ; ALTAMIRANO *et al.*, 2011). Estudos realizados em tecidos cardíacos infectados por *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que a produção de INOs, NO e algumas metaloproteinases (MMPs) nesse local é importante para a modulação e controle da infecção (HOVSEPIAN; MIRKIN; PENAS; MANZANO *et al.*, 2011). A produção simultânea de INOS e NO no macrófago ativado está associada à morte do parasito na célula (CUTRULLIS; PETRAY; CORRAL, 2017). Estudo de Malvezi, 2014, verificou que células tratadas com aspirina (ASA) obtiveram inibição da infecção por *Trypanosoma cruzi*, devido ao fato desse composto estimular a produção de IL-1 β e óxido nítrico pelos macrófagos (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI *et al.*, 2014). Foi verificado em alguns estudos que o protozoário chega a desenvolver um sistema anti-oxidante para tentar eliminar ROS e NO dos macrófagos como método de escape e sobrevivência (ZAGO; HOSAKOTE; KOO; DHIMAN *et al.*, 2016). Diversos estudos prévios já documentaram a produção de NO por macrófagos frente a diferentes estímulos infecciosos, caracterizando esta molécula como um marcador de polarização macrofágica (BUENO-SILVA; KAWAMOTO; ANDO-SUGUIMOTO; CASARIN *et al.*, 2017; CARUSO; FRESTA; MARTINEZ-BECERRA; ANTONIO *et al.*, 2017; TSIKAS; HANFF; BRUNNER, 2017). Corroborando com informações desse estudo, observamos que a infecção por *Trypanosoma cruzi* estimulou a produção de óxido nítrico nos grupos infectados nos três tempos diferentes, porém, a produção de NO foi modulada pelo FSA somente no tempo de 24h (**FIGURA 18**).

Muitos estudos trataram de verificar também a relação de polarização de macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. Estudos *in vitro* verificaram que a infecção estimula macrófagos peritoneais a um perfil celular do tipo M1 (PENAS; MIRKIN; VERA; CEVEY *et al.*, 2015). As células M1 ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF, IL-6, IL-12) e NO que contribuem para a eliminação do parasito nas células. Já macrófagos de perfil M2 contribuem para atenuação da inflamação e promovem efeito de reparo e remodelamento tecidual e angiogênese (BISWAS; MANTOVANI, 2010; TIDBALL; VILLALTA, 2010). Outro importante estudo verificou que a infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* induziu a polarização de macrófagos a um perfil antiinflamatório do tipo M2 no tecido

adiposo, além de contribuir para a progressão do diabetes (CBALEN; CABRAL; SANMARCO; ANDRADA *et al.*, 2016).

Alguns estudos anteriores demonstraram que patógenos intracelulares, podem induzir um mecanismo de escape regulando uma das diferentes vias de sinalização celular na formação do CL dentro dos leucócitos – a via do receptor nuclear PPAR γ (ALMEIDA; ROQUE; MAGALHAES; MATTOS *et al.*, 2014; ALMEIDA; SILVA; MAYA-MONTEIRO; TOROCSIK *et al.*, 2009) Durante a infecção por *M. bovis BCG*, por exemplo, o receptor de superfície celular TLR II (do inglês *toll like-receptor*) ativa o fator de transcrição PPAR γ e a formação de CLs (ALMEIDA; SILVA; MAYA-MONTEIRO; TOROCSIK *et al.*, 2009). A expressão de PPAR γ também foi analisada nos tempos 24, 48 e 72 de horas e os resultados sugeriram que FSA parece induzir a expressão de PPAR γ , sendo que essa expressão foi potencializada na presença da infecção por *Trypanosoma cruzi* no tempo de 72h. A infecção sem FSA induziu a expressão de PPAR γ em relação aos controles nos três tempos analisados (**FIGURA 19**).

Trabalhos utilizando uma cepa colombiana de *T. cruzi* (MHOM / CO / 00 / colombiano), mostraram que o 15dPGJ2, um agonista do PPAR, diminui a densidade relativa do volume de ninhos do parasito no músculo cardíaco (RODRIGUES; MIGUEL; CHICA; NAPIMOGA, 2010). Estudos de Gallardo-Soller *et al.*, 2008, mostraram que PPAR- γ e PPAR- δ promovem o crescimento de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados e a atividade de PPAR induz a ativação de macrófagos em direção a um fenótipo Th2 em um modelo de infecção por *Leishmania major* (GALLARDO-SOLER; GÓMEZ-NIETO; CAMPO; MARATHE *et al.*, 2008). Alguns autores argumentam que a expressão do PPAR- γ diminui após a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, enquanto outros argumentam que essa expressão aumenta, entretanto a maioria dos grupos de pesquisa destaca a participação dos PPARs na modulação do processo inflamatório e na colaboração com o reparo tecidual (HOVSEPIAN; PENAS; MIRKIN; GOREN, 2012).

O *Trypanosoma cruzi* também pode infectar adipócitos como mostra alguns estudos feitos com TA de camundongos infectados, demonstrando que esse protozoário sobrevive no tecido graças a uma mudança de polarização de macrófagos de perfil M1 para M2, limitando assim, mais ainda a resposta imune contra o parasito no local (CBALEN; CABRAL; SANMARCO; ANDRADA *et al.*, 2016). Estudo de Combs, 2005 verificou que o *T. cruzi* infecta tanto o TAB quanto o TAM e que havia mais carga parasitária no TA do que no próprio tecido cardíaco 15 dias pós-infecção (COMBS; NAGAJYOTHI; MUKHERJEE; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Nagajyothi *et al.*, 2012 observou que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* curiosamente diminuiu os níveis do fator de transcrição PPAR γ no TAM e aumentou no TAB de forma

significativa também com 15 dias pós-infecção (NAGAJYOTHI; DESRUISSEAU; MACHADO; UPADHYA *et al.*, 2012).

Vários estudos abordaram o papel das citocinas produzidas por macrófagos mediante a vários agentes infecciosos, porém esse trabalho veio complementar qual o papel do FSA durante a ativação do macrófago e na modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro. Esses dados nos possibilitaram compreender melhor a interação entre o macrófago infectado pelo *Trypanosoma cruzi* e FSA, porém novos estudos deverão ser elaborados para melhor compreensão de como a obesidade pode modular a progressão de doenças e patologias infecciosas.

6. CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados deste projeto de pesquisa e modelo de estudo envolvendo o papel modulador de adipócitos na ativação macrofágica durante a infecção por *Trypanosoma cruzi in vitro*, podemos chegar às seguintes conclusões:

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) induziu um aumento na produção de CLs, sendo esse aumento potencializado na presença da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* nos tempos de 24, 48 e 72 h; A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de FSA induziu um aumento de CLs nos três tempos analisados;

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) não modulou a produção da citocina TNF α em nenhum dos tempos analisados; A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de FSA induziu um aumento de TNF α em relação aos grupos controles nos tempos de 24 e 48 h;

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) induziu um aumento na produção de IL-10, nos grupos controles nos três tempos 24, 48 e 72 h, efeito que foi modulado negativamente nos grupos infectados;

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) induziu um aumento na produção de KC, sendo que esse aumento foi potencializado pela infecção somente no tempo de 24 h; A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de FSA induziu um aumento de KC em relação aos controles nos tempos de 24 e 48h;

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) induziu um aumento na produção de NO, sendo que esse aumento foi potencializado pela infecção somente no tempo de 24 h; A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na ausência de FSA estimulou a produção de NO em relação aos controles nos três tempos diferentes;

✦ O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos (FSA) parece induzir a expressão de PPAR γ , sendo que essa expressão foi potencializada na presença da infecção por *Trypanosoma cruzi* no tempo de 72h; A infecção sem FSA induziu a expressão de PPAR γ em relação aos controles nos três tempos analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, P.; LEVITT KATZ, L. E. Metabolic effects of obesity causing disease in childhood. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, 18, n. 1, p. 23-27, 2011/02// 2011.

AFSHIN, A.; FOROUZANFAR, M. H.; REITSMA, M. B.; SUR, P. *et al.* Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **N Engl J Med**, 377, n. 1, p. 13-27, Jul 6 2017.

ALMEIDA, P. E.; ROQUE, N. R.; MAGALHAES, K. G.; MATTOS, K. A. *et al.* Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. **Biochim Biophys Acta**, 1841, n. 1, p. 97-107, Jan 2014.

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TOROCSIK, D. *et al.* *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **J Immunol**, 183, n. 2, p. 1337-1345, Jul 15 2009.

ALMEIDA, P. E. d.; TOLEDO, D. A. M.; RODRIGUES, G. S. C.; D'AVILA, H. Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism. **Frontiers in Microbiology**, 9, n. 499, 2018-March-20 2018. Mini Review.

ALVARADO-VAZQUEZ, P. A.; BERNAL, L.; PAIGE, C. A.; GROSICK, R. L. *et al.* Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. **Immunobiology**, 222, n. 8-9, p. 900-912, Aug 2017.

ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental parasitology**, 116, p. 44-52, 06/01 2007.

ANDRADE, D.; SERRA, R.; SVENSJO, E.; LIMA, A. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. **Br J Pharmacol**, 165, n. 5, p. 1333-1347, Mar 2012.

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunol Lett**, 71, n. 2, p. 103-109, Feb 1 2000.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 7, p. 2034-2039, Feb 17 2004.

BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Struct Funct**, 20, n. 4, p. 275-284, Aug 1995.

BARCHETTA, I.; CIMINI, F. A.; CICCARELLI, G.; BARONI, M. G. Sick fat: the good and the bad of old and new circulating markers of adipose tissue inflammation. 42, n. 11, p. 1257-1272, Nov 2019.

BARRIAS, E. S.; DUTRA, J. M.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochem Biophys Res Commun**, 363, n. 3, p. 828-834, Nov 23 2007.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, 11, n. 10, p. 889-896, Oct 2010.

BLUHER, M. The inflammatory process of adipose tissue. **Pediatr Endocrinol Rev**, 6, n. 1, p. 24-31, Sep 2008.

BLUHER, M.; WILSON-FRITCH, L.; LESZYK, J.; LAUSTSEN, P. G. *et al.* Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. **J Biol Chem**, 279, n. 30, p. 31902-31909, Jul 23 2004.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, 21, p. 11, 2014.

BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100 Suppl 1, p. 113-120, Mar 2005.

BOZZA, P. T.; MAGALHAES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. **Biochim Biophys Acta**, 1791, n. 6, p. 540-551, Jun 2009.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & therapeutics**, 113, n. 1, p. 30-49, 2007/01// 2007.

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E. S.; CASARIN, R. C. V. *et al.* Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **J Ethnopharmacol**, 207, p. 100-107, Jul 31 2017.

BUSCHOW, S. I.; NOLTE-'T HOEN, E. N.; VAN NIEL, G.; POLS, M. S. *et al.* MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. **Traffic**, 10, n. 10, p. 1528-1542, Oct 2009.

CABALEN, M. E.; CABRAL, M. F.; SANMARCO, L. M.; ANDRADA, M. C. *et al.* Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model. **Oncotarget**, 7, n. 12, p. 13400-13415, Mar 22 2016.

CANCELLO, R.; CLEMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **Bjog**, 113, n. 10, p. 1141-1147, Oct 2006.

CANNON, B.; HEDIN, A.; NEDERGAARD, J. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. **FEBS Letters**, 150, n. 1, p. 129-132, 1982/12/13/ 1982.

CARDONA, P. J.; LLATJOS, R.; GORDILLO, S.; DIAZ, J. *et al.* Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand J Immunol**, 52, n. 2, p. 156-163, Aug 2000.

CARUSO, G.; FRESTA, C. G.; MARTINEZ-BECERRA, F.; ANTONIO, L. *et al.* Carnosine modulates nitric oxide in stimulated murine RAW 264.7 macrophages. **Mol Cell Biochem**, 431, n. 1-2, p. 197-210, Jul 2017.

CHAGAS, C. A new disease entity in man: a report on etiologic and clinical observations. **Int J Epidemiol**, 37, n. 4, p. 694-695, Aug 2008.

CHANG, E.; KIM, C. Y. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. 24, n. 6, Mar 23 2019.

CHENG, H.; LUAN, J.; MU, D.; WANG, Q. *et al.* M1/M2 Macrophages Play Different Roles in Adipogenic Differentiation of PDGFRalpha(+) Preadipocytes In Vitro. **Aesthetic Plast Surg**, 43, n. 2, p. 514-520, Apr 2019.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. **Curr Opin Lipidol**, 14, n. 5, p. 459-468, Oct 2003.

CHITRAJU, C.; WALTHER, T. C.; FARESE, R. V., Jr. The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes. **J Lipid Res**, 60, n. 6, p. 1112-1120, Jun 2019.

CHORLAY, A.; MONTICELLI, L.; VERISSIMO FERREIRA, J.; BEN M'BAREK, K. *et al.* Membrane Asymmetry Imposes Directionality on Lipid Droplet Emergence from the ER. **Dev Cell**, 50, n. 1, p. 25-42.e27, Jul 1 2019.

CHORLAY, A.; THIAM, A. R. An Asymmetry in Monolayer Tension Regulates Lipid Droplet Budding Direction. **Biophys J**, 114, n. 3, p. 631-640, Feb 6 2018.

CHOUDHARY, V.; GOLANI, G.; JOSHI, A. S.; COTTIER, S. *et al.* Architecture of Lipid Droplets in Endoplasmic Reticulum Is Determined by Phospholipid Intrinsic Curvature. **Current Biology**, 28, n. 6, p. 915-926.e919, 2018/03/19/ 2018.

CHOUDHARY, V.; OJHA, N.; GOLDEN, A.; PRINZ, W. A. A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. **J Cell Biol**, 211, n. 2, p. 261-271, Oct 26 2015.

CILDIR, G.; AKINCILAR, S. C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. **Trends Mol Med**, 19, n. 8, p. 487-500, Aug 2013.

CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 73, n. 1, p. 9-15, Jul 2005.

COMBS, T. P.; NAGAJYOTHI; MUKHERJEE, S.; DE ALMEIDA, C. J. *et al.* The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. **J Biol Chem**, 280, n. 25, p. 24085-24094, Jun 24 2005.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M. *et al.* In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 16, n. 3, p. 315-327, 1985/09/01/ 1985.

CORREA, L. H.; HEYN, G. S.; MAGALHAES, K. G. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, 8, n. 7, Jun 30 2019.

COTILLARD, A.; POITOU, C.; TORCIVIA, A.; BOUILLLOT, J. L. *et al.* Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin resistance after gastric bypass. **J Clin Endocrinol Metab**, 99, n. 8, p. E1466-1470, Aug 2014.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

CUTRULLIS, R. A.; PETRAY, P. B.; CORRAL, R. S. MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. **Immunobiology**, 222, n. 2, p. 423-431, Feb 2017.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L. *et al.* Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. **J Infect Dis**, 204, n. 6, p. 951-961, Sep 15 2011.

D'AVILA, H.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **Int Immunopharmacol**, 8, n. 10, p. 1308-1315, Oct 2008.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A.; MELO, R. C. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators Inflamm**, 2012, p. 478601, 2012.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol**, 25, n. 1, p. 4-7, Jan 2004.

DASHTY, M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. **Clin Biochem**, 46, n. 15, p. 1339-1352, Oct 2013.

DE FILIPPO, K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; HOGG, N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **The Journal of Immunology**, 180, n. 6, p. 4308, 2008.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, 2010, 2010.

DEBELS, H.; GALEA, L.; HAN, X. L.; PALMER, J. *et al.* Macrophages play a key role in angiogenesis and adipogenesis in a mouse tissue engineering model. **Tissue Eng Part A**, 19, n. 23-24, p. 2615-2625, Dec 2013.

DENG, Z. B.; POLIAKOV, A.; HARDY, R. W.; CLEMENTS, R. *et al.* Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. **Diabetes**, 58, n. 11, p. 2498-2505, Nov 2009.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends in parasitology**, 21, n. 1, p. 35-41, 2005/01// 2005.

EBBELING, C. B.; PAWLAK, D. B.; LUDWIG, D. S. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. **Lancet**, 360, n. 9331, p. 473-482, Aug 10 2002.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, 365, n. 9468, p. 1415-1428, Apr 16-22 2005.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metab**, 4, n. 4, p. 263-273, Oct 2006.

FAZOLINI, N. P.; CRUZ, A. L.; WERNECK, M. B.; VIOLA, J. P. *et al.* Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. **Cell Cycle**, 14, n. 16, p. 2667-2676, 2015.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; GERALDO YONEYAMA, K. A.; STRAUS, A. H. *et al.* Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. **Int J Parasitol**, 37, n. 13, p. 1431-1441, Nov 2007.

FITARELLI, D. B.; HORN, J. F. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 31, p. 310-314, 2009.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 316, n. 2, p. 129-139, 2010/03/25/ 2010.

GALLARDO-SOLER, A.; GÓMEZ-NIETO, C.; CAMPO, M. L.; MARATHE, C. *et al.* Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, 22, n. 6, p. 1394-1402, 2008/06// 2008.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GONZALEZ, M. S. *et al.* Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **J Insect Physiol**, 53, n. 1, p. 11-21, Jan 2007.

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochem Pharmacol**, 66, n. 8, p. 1403-1408, Oct 15 2003.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 12, p. 895-906, Dec 2006.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L. *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, 22, n. 10, p. 2501-2506, Oct 1992.

GHERLAN, I.; VLADOIU, S.; ALEXIU, F.; GIURCANEANU, M. *et al.* Adipocytokine profile and insulin resistance in childhood obesity. **Maedica (Buchar)**, 7, n. 3, p. 205-213, Sep 2012.

GHO, Y. S.; LEE, C. Emergent properties of extracellular vesicles: a holistic approach to decode the complexity of intercellular communication networks. **Mol Biosyst**, 13, n. 7, p. 1291-1296, Jun 27 2017.

GIMENO, R. E.; KLAMAN, L. D. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. **Curr Opin Pharmacol**, 5, n. 2, p. 122-128, Apr 2005.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W. *et al.* Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **J Biol Chem**, 274, n. 6, p. 3461-3468, Feb 5 1999.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and Acquired Immunity in the Pathogenesis of Chagas Disease. **Autoimmunity**, 37, n. 5, p. 399-409, 2004/08/01 2004.

GONCALVES, C. S.; AVILA, A. R.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasit Vectors**, 11, n. 1, p. 83, Feb 6 2018.

GONZALEZ, F. B.; VILLAR, S. R.; TONEATTO, J.; PACINI, M. F. *et al.* Immune response triggered by *Trypanosoma cruzi* infection strikes adipose tissue homeostasis altering lipid storage, enzyme profile and adipokine expression. **Med Microbiol Immunol**, 208, n. 5, p. 651-666, Oct 2019.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am J Clin Nutr**, 83, n. 2, p. 461s-465s, Feb 2006.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiol Rev**, 78, n. 3, p. 783-809, Jul 1998.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, 29, p. 415-445, 2011.

GRIPPA, A.; BUXO, L.; MORA, G.; FUNAYA, C. *et al.* The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. **J Cell Biol**, 211, n. 4, p. 829-844, Nov 23 2015.

GROOM, Z. C.; PROTOPAPAS, A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **Int J Gen Med**, 10, p. 101-111, 2017.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Semin Diagn Pathol**, 36, n. 3, p. 164-169, May 2019.

GUILHERME, A.; VIRBASIOUS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, n. 5, p. 367-377, May 2008.

HALBERG, N.; KHAN, T.; TRUJILLO, M. E.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. **Mol Cell Biol**, 29, n. 16, p. 4467-4483, Aug 2009.

HARMAN-BOEHM, I.; BLUHER, M.; REDEL, H.; SION-VARDY, N. *et al.* Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, 92, n. 6, p. 2240-2247, Jun 2007.

HARTE, A. L.; TRIPATHI, G.; PIYA, M. K.; BARBER, T. M. *et al.* NF κ B as a potent regulator of inflammation in human adipose tissue, influenced by depot, adiposity, T2DM status, and TNF α . **Obesity (Silver Spring)**, 21, n. 11, p. 2322-2330, Nov 2013.

HAYES, M.; CHOUDHARY, V.; OJHA, N.; SHIN, J. J. *et al.* Fat storage-inducing transmembrane (FIT or FITM) proteins are related to lipid phosphatase/phosphotransferase enzymes. **Microb Cell**, 5, n. 2, p. 88-103, Dec 28 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, 140, n. 6, p. 900-917, Mar 19 2010.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J. *et al.* Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med**, 357, n. 10, p. 1018-1027, Sep 6 2007.

HOVSEPIAN, E.; MIRKIN, G. A.; PENAS, F.; MANZANO, A. *et al.* Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J(2) in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. **Int J Parasitol**, 41, n. 5, p. 553-562, Apr 2011.

HOVSEPIAN, E.; PENAS, F.; MIRKIN, G. A.; GOREN, N. B. Role of PPARs in Trypanosoma cruzi Infection: Implications for Chagas Disease Therapy. **PPAR Research**, 2012, p. 8, 2012.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD e cols. Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med** 2007;357(10):1018-27.

<https://www.healthexpress.eu/br/obesidade-2017-estatisticas-e-tendencias.html>. Acessado em 10/07/2019

<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>. Acessado em 04/09/2019

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acessado em 10/07/2019

HU, E.; TONTONNOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 21, p. 9856-9860, Oct 10 1995.

HUANG-DORAN, I.; ZHANG, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. **Trends Endocrinol Metab**, 28, n. 1, p. 3-18, Jan 2017.

ISOMAA, B.; ALMGREN, P.; TUOMI, T.; FORSEN, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, 24, n. 4, p. 683-689, Apr 2001.

JEFFERY, E.; CHURCH, C. D.; HOLTRUP, B.; COLMAN, L. *et al.* Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. **Nat Cell Biol**, 17, n. 4, p. 376-385, Apr 2015.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J Immunol**, 188, n. 1, p. 21-28, Jan 1 2012.

KESSLER, R. L.; CONTRERAS, V. T.; MARLIERE, N. P.; APARECIDA GUARNERI, A. *et al.* Recently differentiated epimastigotes from Trypanosoma cruzi are infective to the mammalian host. **PLoS One**, 12, n. 5, p. 1-11, Jun 2017.

KHAN, T.; MUISE, E. S.; IYENGAR, P.; WANG, Z. V. *et al.* Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. **Mol Cell Biol**, 29, n. 6, p. 1575-1591, Mar 2009.

KLOTING, N.; STUMVOLL, M.; BLUHER, M. [The biology of visceral fat]. **Internist (Berl)**, 48, n. 2, p. 126-133, Feb 2007.

KNUBEL, C. P.; INSFRAN, C.; MARTINEZ, F. F.; DIAZ LUJAN, C. *et al.* 3-Hydroxykynurenine, a Tryptophan Metabolite Generated during the Infection, Is Active Against *Trypanosoma cruzi*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 8, n. 7, p. 757-761, 2017/07/13 2017.

KNUBEL, C. P.; MARTINEZ, F. F.; ACOSTA RODRIGUEZ, E. V.; ALTAMIRANO, A. *et al.* 3-Hydroxy kynurenine treatment controls *T. cruzi* replication and the inflammatory pathology preventing the clinical symptoms of chronic Chagas disease. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e26550, 2011.

KRANENDONK, M. E.; VISSEREN, F. L.; VAN BALKOM, B. W.; NOLTE-'T HOEN, E. N. *et al.* Human adipocyte extracellular vesicles in reciprocal signaling between adipocytes and macrophages. **Obesity (Silver Spring)**, 22, n. 5, p. 1296-1308, May 2014.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, 16, p. 13-34, 2009.

LAI, C. S.; CHEN, Y. Y.; LEE, P. S.; KALYANAM, N. *et al.* Bisdemethoxycurcumin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes and Suppresses Obesity in High-Fat Diet-Fed C57BL/6 Mice. **J Agric Food Chem**, 64, n. 4, p. 821-830, Feb 3 2016.

LEE, J.; CACALANO, G.; CAMERATO, T.; TOY, K. *et al.* Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. **J Immunol**, 155, n. 4, p. 2158-2164, Aug 15 1995.

LEFEBVRE, P. J.; SCHEEN, A. J. Obesity: causes and new treatments. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 109 Suppl 2, p. S215-224, 2001.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, 20, n. 3, p. 107-114, Apr 2009.

LEIRIÃO, P.; RODRIGUES, C. D.; ALBUQUERQUE, S. S.; MOTA, M. M. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. **EMBO reports**, 5, n. 12, p. 1142-1147, 2004/12// 2004.

LI, G.; NING, C.; MA, Y.; JIN, L. *et al.* miR-26b Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation Through Targeting PTEN. **DNA Cell Biol**, 36, n. 8, p. 672-681, Aug 2017.

LICHTNEKERT, J.; KAWAKAMI, T.; PARKS, W. C.; DUFFIELD, J. S. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. **Curr Opin Pharmacol**, 13, n. 4, p. 555-564, Aug 2013.

LIU, Q.; ZHOU, X. N. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. **Infect Dis Poverty**, 4, p. 60, Dec 28 2015.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUQUI, N. G.; LUCCHETTI, B. F. C. *et al.* Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. **Front Immunol**, 9, p. 896, 2018.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L. *et al.* Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, 102, n. 24, p. 3003-3008, Dec 12 2000.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A. *et al.* Infection by Trypanosoma cruzi. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J Biol Chem**, 276, n. 22, p. 19382-19389, Jun 1 2001.

MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M. *et al.* Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of Trypanosoma cruzi in mouse peritoneal macrophages. 2014, p. 580919, 2014.

MANARIN, R.; VILLAR, S. R.; FERNANDEZ BUSSY, R.; GONZALEZ, F. B. *et al.* Reciprocal influences between leptin and glucocorticoids during acute Trypanosoma cruzi infection. **Med Microbiol Immunol**, 202, n. 5, p. 339-352, Oct 2013.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, 25, n. 12, p. 677-686, Dec 2004.

MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; DE MENEZES-NETO, A. *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. **J Extracell Vesicles**, 3, p. 25040, 2014.

MASTROCOLA, R.; ARAGNO, M.; ALLOATTI, G.; COLLINO, M. *et al.* Metaflammation: Tissue-Specific Alterations of the NLRP3 Inflammasome Platform in Metabolic Syndrome. **Curr Med Chem**, 25, n. 11, p. 1294-1310, 2018.

MATHIEU, P. S.; LOBOA, E. G. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. **Tissue Eng Part B Rev**, 18, n. 6, p. 436-444, Dec 2012.

MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. **FEBS Lett**, 580, n. 12, p. 2917-2921, May 22 2006.

MATTOS, K. A. d.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C. V.; BOZZA, P. T. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in Mycobacterium leprae pathogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107, p. 156-166, 2012.

MAURIZI, G.; DELLA GUARDIA, L.; MAURIZI, A.; POLONI, A. Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. 233, n. 1, p. 88-97, Jan 2018.

MAYA-MONTEIRO, C.; BOZZA, P. Leptin and mTOR: Partners in metabolism and inflammation. **Cell Cycle**, 7, n. 12, p. 1713-1717, 2008/06/15 2008.

MELO, R. C. N.; D'ÁVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E. *et al.* Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue and Cell**, 35, n. 1, p. 59-67, 2003/02/01/ 2003.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Lett**, 470, n. 3, p. 305-308, Mar 31 2000.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. **Int J Mol Sci**, 17, n. 1, Jan 19 2016.

MOTA DE SA, P.; RICHARD, A. J.; HANG, H.; STEPHENS, J. M. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. **Compr Physiol**, 7, n. 2, p. 635-674, Mar 16 2017.

MOTOSHIMA, H.; WU, X.; SINHA, M. K.; HARDY, V. E. *et al.* Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. **J Clin Endocrinol Metab**, 87, n. 12, p. 5662-5667, Dec 2002.

MULLER, G.; JUNG, C.; STRAUB, J.; WIED, S. *et al.* Induced release of membrane vesicles from rat adipocytes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored microdomain and lipid droplet signalling proteins. **Cell Signal**, 21, n. 2, p. 324-338, Feb 2009.

MURPHY, D. J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. **Protoplasma**, 249, n. 3, p. 541-585, Jul 2012.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M. S.; MACHADO, F. S.; UPADHYA, R. *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **J Infect Dis**, 205, n. 5, p. 830-840, Mar 1 2012.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M. S.; THIRUVUR, N.; WEISS, L. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, 16, n. 9, p. 1992-1997, 2008/09// 2008.

NAGAJYOTHI, J. F.; WEISS, L. M. Advances in understanding the role of adipose tissue and mitochondrial oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* infection. 8, 2019.

NIEMELÄ, S.; MIETTINEN, S.; SARKANEN, J.-R.; ASHAMMAKHI, N. Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. **Topics in Tissue Engineering. Volume 4**, 01/01 2008.

NOGUEIRA, N. F. S.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; SOUZA, W. d. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental parasitology**, 2007 v.116 no.2, n. no. 2, p. pp. 120-128, 2007-06 2007. Article.

NOURIAN, M.; CHALESHI, V.; PISHKAR, L.; AZIMZADEH, P. *et al.* Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)-alpha mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF-alpha gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases. **Biomed Rep**, 6, n. 6, p. 698-702, Jun 2017.

NOVAES, R. D.; GONÇALVES, R. V.; PENITENTE, A. R.; BOZI, L. H. M. *et al.* Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy. **Life Sciences**, 152, p. 210-219, 2016/05/01/ 2016.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte differentiation and gene expression. **J Nutr**, 130, n. 12, p. 3122s-3126s, Dec 2000.

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, 62, n. 9, p. 767-776, Aug 27 2013.

OHLSON, L. O.; LARSSON, B.; SVARDSUDD, K.; WELIN, L. *et al.* The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. **Diabetes**, 34, n. 10, p. 1055-1058, Oct 1985.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, 72, p. 219-246, 2010.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A. *et al.* Trypanosoma cruzi infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. **Science**, 234, n. 4776, p. 603, 1986.

PATEL, Y. M.; LANE, M. D. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. **J Biol Chem**, 275, n. 23, p. 17653-17660, Jun 9 2000.

PENAS, F.; MIRKIN, G. A.; VERA, M.; CEVEY, A. *et al.* Treatment in vitro with PPARalpha and PPARgamma ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. **Biochim Biophys Acta**, 1852, n. 5, p. 893-904, May 2015.

PISCHON, T.; BOEING, H.; HOFFMANN, K.; BERGMANN, M. *et al.* General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. **N Engl J Med**, 359, n. 20, p. 2105-2120, Nov 13 2008.

PYC, M.; CAI, Y.; GIDDA, S. K.; YURCHENKO, O. *et al.* Arabidopsis lipid droplet-associated protein (LDAP) - interacting protein (LDIP) influences lipid droplet size and neutral lipid homeostasis in both leaves and seeds. **Plant J**, 92, n. 6, p. 1182-1201, Dec 2017.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, 144, n. 9, p. 3765-3773, Sep 2003.

RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, 26, n. 2, p. 275-291, Jun 2012.

RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 17 2010.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **J Nutr Biochem**, 19, n. 11, p. 717-726, Nov 2008.

RODRIGUES, W. F.; MIGUEL, C. B.; CHICA, J. E. L.; NAPIMOGA, M. H. 15d-PGJ2 modulates acute immune responses to Trypanosoma cruzi infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105, p. 137-143, 2010.

ROFFE, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P. *et al.* IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, 188, n. 2, p. 649-660, Jan 15 2012.

ROMANIUK, M. A.; FRASCH, A. C.; CASSOLA, A. Translational repression by an RNA-binding protein promotes differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. 14, n. 6, p. e1007059, Jun 2018.

ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X.; SAKAI, S. *et al.* C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes Dev**, 16, n. 1, p. 22-26, Jan 1 2002.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7, n. 12, p. 885-896, Dec 2006.

ROSEN, E. D.; SARRAF, P.; TROY, A. E.; BRADWIN, G. *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Mol Cell**, 4, n. 4, p. 611-617, Oct 1999.

ROTHFUCHS, A. G.; ROFFE, E.; GIBSON, A.; CHEEVER, A. W. *et al.* Mannose-binding lectin regulates host resistance and pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, 7, n. 11, p. e47835, 2012.

RUF, W.; SAMAD, F. Tissue factor pathways linking obesity and inflammation. **Hamostaseologie**, 35, n. 3, p. 279-283, 2015.

SALO, V. T.; BELEVICH, I.; LI, S. Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. 35, n. 24, p. 2699-2716, Dec 15 2016.

SALO, V. T.; LI, S.; VIHINEN, H.; HOLTITA-VUORI, M. *et al.* Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact. **Dev Cell**, 50, n. 4, p. 478-493.e479, Aug 19 2019.

SALVATELLA, R.; IRABEDRA, P.; SANCHEZ, D.; CASTELLANOS, L. G. *et al.* South-south cooperation for Chagas disease. **Lancet**, 382, n. 9890, p. 395-396, Aug 3 2013.

SARAF, N.; SHARMA, P. K.; MONDAL, S. C.; GARG, V. K. *et al.* Role of PPARg2 transcription factor in thiazolidinedione-induced insulin sensitization. **J Pharm Pharmacol**, 64, n. 2, p. 161-171, Feb 2012.

SARJEANT, K.; STEPHENS, J. M. Adipogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 9, p. a008417, Sep 1 2012.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect Immun**, 59, n. 2, p. 645-654, Feb 1991.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, 55, n. 6, p. 1537-1545, Jun 2006.

SCHIPPER, H. S.; PRAKKEN, B.; KALKHOVEN, E.; BOES, M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends Endocrinol Metab**, 23, n. 8, p. 407-415, Aug 2012.

SCHIPPER, H. S.; RAKHSHANDEHROO, M.; VAN DE GRAAF, S. F.; VENKEN, K. *et al.* Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. **J Clin Invest**, 122, n. 9, p. 3343-3354, Sep 2012.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, 115, n. 1-2, p. 14-21, Jul-Aug 2010.

SELVARAJAN, S.; LUND, L. R.; TAKEUCHI, T.; CRAIK, C. S. *et al.* A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation. **Nat Cell Biol**, 3, n. 3, p. 267-275, Mar 2001.

SHEN, M.; ZHOU, L.; ZHOU, P.; ZHOU, W. *et al.* Lymphotoxin beta receptor activation promotes mRNA expression of RelA and pro-inflammatory cytokines TNFalpha and IL-1beta in bladder cancer cells. **Mol Med Rep**, 16, n. 1, p. 937-942, Jul 2017.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A. *et al.* The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31, p. 111-115, 1998.

SILVA, L. D. M.; GATTO, M.; TEODORO, M.; GOLIM, M. *et al.* Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease. **Scandinavian journal of immunology**, 85, 10/26 2016.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, 92, n. 3, p. 1023-1033, Mar 2007.

SOLINAS, G.; VILCU, C.; NEELS, J. G.; BANDYOPADHYAY, G. K. *et al.* JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. **Cell Metab**, 6, n. 5, p. 386-397, Nov 2007.

SPALDING, K. L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P. O.; BERNARD, S. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, 453, n. 7196, p. 783-787, Jun 5 2008.

STEFAN, N.; STUMVOLL, M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. **Horm Metab Res**, 34, n. 9, p. 469-474, Sep 2002.

SUGANAMI, T.; TANIMOTO-KOYAMA, K.; NISHIDA, J.; ITOH, M. *et al.* Role of the Toll-like Receptor 4/NF- κ B Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 27, n. 1, p. 84-91, 2007/01/01 2007.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest**, 121, n. 6, p. 2094-2101, Jun 2011.

TAN, J. S.; SEOW, C. J.; GOH, V. J.; SILVER, D. L. Recent advances in understanding proteins involved in lipid droplet formation, growth and fusion. **J Genet Genomics**, 41, n. 5, p. 251-259, May 20 2014.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R. *et al.* The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. **J Biol Chem**, 277, n. 46, p. 44507-44512, Nov 15 2002.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, 18, n. 6, p. 262-265, Jun 2002.

THERY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 8, p. 581-593, Aug 2009.

THIAM, A. R.; BELLER, M. The why, when and how of lipid droplet diversity. 130, n. 2, p. 315-324, Jan 15 2017.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 298, n. 5, p. R1173-1187, May 2010.

TOLEDO, D. A.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; MILAN-GARCES, E. A. *et al.* Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. 11, n. 8, p. e0160433, 2016.

TROCOLI TORRECILHAS, A. C.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; DA SILVA, J. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**, 11, n. 1, p. 29-39, Jan 2009.

TSIKAS, D.; HANFF, E.; BRUNNER, G. Helicobacter pylori, Its Urease and Carbonic Anhydrases, and Macrophage Nitric Oxide Synthase. **Trends Microbiol**, 25, n. 8, p. 601-602, Aug 2017.

TUTINO, V.; ORLANDO, A.; RUSSO, F.; NOTARNICOLA, M. Hydroxytyrosol Inhibits Cannabinoid CB1 Receptor Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocyte Cell Line. **J Cell Physiol**, 231, n. 2, p. 483-489, Feb 2016.

VALLOCHI, A. L.; TEIXEIRA, L.; OLIVEIRA, K. d. S.; MAYA-MONTEIRO, C. M. *et al.* Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite Interactions. **Frontiers in Immunology**, 9, n. 1022, 2018-May-23 2018. Review.

VALM, A. M.; COHEN, S.; LEGANT, W. R.; MELUNIS, J. *et al.* Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. **Nature**, 546, n. 7656, p. 162-167, Jun 1 2017.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun**, 62, n. 11, p. 5177-5182, Nov 1994.

VISHVANATH, L.; MACPHERSON, K. A.; HEPLER, C.; WANG, Q. A. *et al.* Pdgfrbeta+ Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. **Cell Metab**, 23, n. 2, p. 350-359, Feb 9 2016.

VONA-DAVIS, L.; ROSE, D. P. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. **Endocr Relat Cancer**, 14, n. 2, p. 189-206, Jun 2007.

VRAY, B.; CAMBY, I.; VERCRUYSSSE, V.; MIJATOVIC, T. *et al.* Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, 14, n. 7, p. 647-657, Jul 2004.

WANG, Q. A.; TAO, C.; GUPTA, R. K.; SCHERER, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, 19, p. 1338, 09/01/online 2013.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec 2003.

WHITE, U. A.; STEPHENS, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Mol Cell Endocrinol**, 318, n. 1-2, p. 10-14, Apr 29 2010.

XU, M.; WANG, X. Critical roles of mucin-1 in sensitivity of lung cancer cells to tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. **Cell Biol Toxicol**, 33, n. 4, p. 361-371, Aug 2017.

XUE, X.; QIU, Y.; YANG, H. L. Immunoregulatory Role of MicroRNA-21 in Macrophages in Response to Bacillus Calmette-Guerin Infection Involves Modulation of the TLR4/MyD88 Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 42, n. 1, p. 91-102, 2017.

YACOUB, S.; MOCUMBI, A. O.; YACOUB, M. H. Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease: myocardial disease. **Heart**, 94, n. 2, p. 244-248, Feb 2008.

YAMASHITA, A.; SOGA, Y.; IWAMOTO, Y.; ASANO, T. *et al.* DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. **Int J Obes (Lond)**, 32, n. 11, p. 1725-1729, Nov 2008.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 78, p. 87-111, 2006.

ZAGO, M. P.; HOSAKOTE, Y. M.; KOO, S. J.; DHIMAN, M. *et al.* Tci Isolates of Trypanosoma cruzi Exploit the Antioxidant Network for Enhanced Intracellular Survival in Macrophages and Virulence in Mice. **Infect Immun**, 84, n. 6, p. 1842-1856, Jun 2016.

ZHAO, L.; GREGOIRE, F.; SOOK SUL, H. Transient Induction of ENC-1, a Kelch-related Actin-binding Protein, Is Required for Adipocyte Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 22, p. 16845-16850, June 2, 2000 2000.

Dissertação:

AMARAL, L. P. Efeitos da Leptina na Adipogênese e Produção de Mediadores Inflamatórios por Adipócitos 3T3-L1 (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz