

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

Ana Luíza da Silva Albertoni

**ESTUDO DO PAPEL MODULADOR DE ADIPÓCITOS NA ATIVAÇÃO  
MACROFÁGICA DURANTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis*  
BCG *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2017

**ANA LUÍZA DA SILVA ALBERTONI**

**ESTUDO DO PAPEL MODULADOR DE ADIPÓCITOS NA ATIVAÇÃO  
MACROFÁGICA DURANTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium bovis*  
BCG *IN VITRO***

“Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Elaine de Almeida**

Juiz de Fora  
2017

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

Albertoni, Ana Luíza da Silva Albertoni.

Estudo do papel modulador de adipócitos na ativação macrofágica durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG in vitro / Ana Luíza da Silva Albertoni Albertoni. -- 2017.

82 p.

Orientador: Patrícia Elaine de Almeida Almeida

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Adipócitos. 2. Macrófagos. 3. Infecção micobacteriana. 4. Corpúsculos Lipídicos. 5. PPARgamma. I. Almeida, Patrícia Elaine de Almeida, orient. II. Título.

“À minha amada família, que mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes, nunca deixando de acreditar em mim e nos meus sonhos”.

## AGRADECIMENTOS

*“Aqueles que passam por nós, não vão sem nós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*

Antoine de Saint-Exupéry.

Durante pouco mais de 1 ano e meio em que iniciei esta pesquisa e meu projeto de mestrado, foi uma árdua jornada de desafios, construção e amadurecimento. Nenhuma etapa foi realizada de forma fácil e sem esforço. Portanto, hoje venho agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com essa realização.

Primeiramente agradeço a Deus, por guiar todos os meus passos e me dar forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Antônio e Maria Imaculada, por toda confiança e incentivo, pela educação base, valores ensinados, apoio nos meus estudos e por muitas vezes renunciarem aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Essa conquista também é de vocês!

À minha avó Arminda, por quem tenho amor incondicional e eterno. Obrigada por me ensinar a ser nobre, na essência da palavra. Obrigada por toda sabedoria ensinada, pelo otimismo, por sempre torcer e rezar por mim.

Ao meu querido irmão, Luis Gustavo, que vibra comigo a cada vitória, que alegra muitos dos meus finais de semana, e que mesmo distante cuida de mim.

Ao Luis Orlando, sem palavras para agradecer tamanho apoio. Você é um dos principais personagens dessa história. Obrigada pela força e incentivo nos momentos que mais precisei, pela compreensão quanto aos finais de semana de estudo, leitura, de idas ao laboratório (e por esperar horas quando dizia que seria só 15 minutos...), pela paciência em momentos de estresse e nervosismo... e por todo amor a mim dedicado.

Agradeço à minha Orientadora, Dr<sup>a</sup> Patrícia Elaine de Almeida. Cada ensinamento e cada palavra sua foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Agradeço imensamente por toda confiança depositada em mim, por toda experiência compartilhada, pela disponibilidade e pelas ajudas na bancada, pela paciência e conselhos. Para mim, é uma honra e orgulho tê-la como orientadora por todos esses anos. Quando “crescer” quero ser como você!

Gostaria de agradecer também, à banca examinadora, Dr<sup>a</sup> Heloísa da Silva D'Ávila Bizarro e Dr<sup>a</sup> Clarissa Maya Monteiro. Desde já, agradeço pela disponibilidade, por todas as considerações, sugestões, correções, ressalvas, críticas, elogios, contribuindo assim para a finalização deste trabalho.

Novamente agradeço a Dr<sup>a</sup> Clarissa, a Me. Lohanna Palhinha do Amaral e ao Dr<sup>o</sup> Eugênio Hootz, pelo suporte inicial e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas, para que este projeto fosse desenvolvido.

Agradeço também à Dr<sup>a</sup> Heloísa e a Dr<sup>a</sup> Rossana Melo pela ajuda com recursos e pelo conhecimento compartilhado sempre que necessário para a minha formação.

Aos meus amigos, colegas de laboratório e demais integrantes do Laboratório de Biologia Celular, pois sem vocês tudo seria mais difícil. Werner, Laíris, Carol, Remy, Marco Antônio, Nathalia e Gabriel. Obrigada pela dedicação e contribuição neste trabalho, pelas discussões proporcionadas e pelo bom humor de todos os dias, mesmo durante os “apuros” e experimentos intermináveis.

À minha segunda família: Aline, Vanessa e Gabrielli. Obrigada por estarem sempre do meu lado e por me apoiarem durante cada etapa dessa jornada. Pela compreensão quanto aos momentos de estudo, pelas horas de conversa e desabafo, por aturarem meu estresse, mau humor e a cara amarrada às vezes, pelos conselhos e alegrias compartilhadas. Amo vocês!

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias e à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) por possibilitar a concretização do projeto de mestrado e por proporcionar meios que me permitiram alcançar o conhecimento, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço também as agências de fomento que nos auxiliaram com recursos e financiamentos imprescindíveis: Capes, Fapemig, CNPq, Laboratório de Imunofarmacologia (Fio Cruz), PPGCBio, Laboratório de Bioquímica (UFJF) e ao Laboratório de Biologia Celular.

Aos demais amigos e familiares que torcem por mim, mesmo que distantes, e que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste projeto, o meu muito obrigada!

## RESUMO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada pelo excesso de gordura corporal e por um estado inflamatório de baixo grau, conhecido como metainflamação. Atualmente, é um dos principais problemas de saúde pública do mundo. Dados da OMS indicam que 13% da população mundial é obesa e no Brasil, o índice subiu para 17,9% da população em 2014. Fatores genéticos, dieta, desordens metabólicas, como intolerância à glicose, dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica, desbalanço hormonal e mudanças na microbiota intestinal, são gatilhos da inflamação envolvendo adipócitos. O tecido adiposo obeso é caracterizado pelo aumento da infiltração de macrófagos, sendo estes uma fonte importante de inflamação neste tecido. Fatores transcricionais com propriedades imunorregulatórias estão envolvidos em processos inflamatórios e na adipogênese. PPAR $\gamma$  é um importante receptor ativado por ligantes lipídicos, regulador central da adipogênese, com funções na ativação de células do sistema imune e no metabolismo lipídico. Dados de nosso grupo demonstraram que ativação de PPAR $\gamma$  induz a biogênese de organelas dinâmicas denominadas Corpúsculos Lipídicos (CLs) durante infecção micobacteriana. Estas organelas possuem funções ativas no estoque de lipídios para geração de energia, síntese de membrana, síntese de mediadores inflamatórios, sinalização celular e inflamação. Além disso, os CL em macrófagos funcionam como sítios para sobrevivência de patógenos, como as micobactérias. Apesar do impacto da obesidade em doenças metabólicas e cardiovasculares ser bem compreendido, os mecanismos envolvidos na relação entre adipócitos e macrófagos infectados com patógenos intracelulares não são conhecidos, sendo este esclarecimento o objetivo de nosso estudo. Para isso, diferenciáramos células NIH3T3-L1 em adipócitos e utilizamos o sobrenadante obtido, para estimular macrófagos peritoneais infectados ou não com *M. bovis* BCG. Nós avaliamos a biogênese de corpúsculos lipídicos, expressão de PPAR $\gamma$ , síntese e secreção de citocinas, adipocinas e NO. Os resultados comprovaram que a diferenciação de células NIH3T3-L1 em adipócitos é um processo eficiente que envolve mudanças na morfologia celular e acúmulo de Corpúsculos Lipídicos. O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos potencializou a biogênese de CLs, assim como a expressão de PPAR $\gamma$ , na presença de infecção micobacteriana. Nos tempos de 6 e 48 horas de estímulo com sobrenadante e infecção, a produção de TNF- $\alpha$  também foi potencializada, porém um decréscimo significativo foi observado no tempo de 24 horas. Quanto aos níveis de IL-10, um aumento foi observado na presença de infecção e estímulo com sobrenadante nos três tempos analisados. Além disso, apenas no tempo de 24 h observamos a secreção de nitrito de modo significativo pelos macrófagos peritoneais infectados, efeito este independente do estímulo com sobrenadante. Quanto às adipocinas, importantes no desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica, analisamos os níveis de leptina produzida pelos macrófagos que não foram significativos, enquanto a produção de adiponectina, apresentou-se aumentada nos macrófagos controles estimulados com sobrenadante, efeito este, que foi inibido durante a infecção por BCG. Assim, nossos resultados sugerem, um efeito modulador de fatores secretados por adipócitos na ativação de macrófagos, atribuídos a formação de corpúsculos lipídicos, expressão de PPAR $\gamma$ , síntese de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-10 e uma modulação negativa da produção de adiponectina durante a infecção por *M. bovis* BCG.

Palavras chaves: Adipócitos, Macrófagos, Corpúsculos Lipídicos. PPAR $\gamma$ . *Mycobacterium bovis* BCG

## ABSTRACT

Obesity is a chronic multifactorial disease characterized by excess of body fat and a low- grade inflammatory state, known as meta-inflammation. It is currently one of the world's leading public health problems. WHO data indicate that 13% of the world population is obese, in Brazil, the obesity index was 17.9% of the population in 2014. In addition to genetic factors, diet and metabolic disorders, such as glucose intolerance, dyslipidemia, systemic arterial hypertension, hormonal imbalance and changes in the intestinal microbiota have been proposed as triggers for inflammation involving adipocytes. Recent studies have shown that obese adipose tissue is characterized by increased infiltration of macrophages, suggesting that these are an important source of inflammation in this tissue. Transcriptional factors with immunoregulatory properties are involved in inflammatory processes and adipogenesis. Such as the PPAR $\gamma$ , is a receptor activated by lipid ligands, central regulator of adipogenesis, with functions in the immune cells activation and lipid metabolism. Data from our group, demonstrated that PPAR $\gamma$  activation induces the biogenesis of dynamic organelles, the Lipid Droplets (LD) during mycobacterial infection. These organelles have functions in lipid storage for energy generation, membrane synthesis, inflammatory mediators synthesis, cell signaling and inflammation. Moreover, the LD in macrophages are niches for the pathogens survival. Although the impact of obesity on metabolic and cardiovascular diseases is understood, the mechanisms involved in the interactions between adipocytes and macrophages infected with intracellular pathogens are not known. In this study we differentiated NIH3T3-L1 cells into adipocytes and used the supernatant obtained to stimulate peritoneal macrophages infected or not with *M. bovis* BCG. We analyze the lipids droplets formation, PPAR $\gamma$  expression, cytokine, adipokines and NO synthesis. The results have shown that NIH3T3-L1 cells differentiation into adipocytes is an efficient process involving changes in cell morphology and LD storage. The macrophages stimulation with adipocyte supernatant was able to potentiated LD biogenesis, as well as, PPAR $\gamma$  activation, during mycobacterial infection. After 6 and 48 hours of stimulation and infection, the TNF- $\alpha$  levels were also potentiated, although a significant decrease was observed after 24 hours of infection. The IL-10 levels, was increase in the presence of infection and supernatant stimulation at 6, 24 and 48 hours after infection. To nitrite analysis, we observe that after 24 h of infection, there was an increase of levels secreted by macrophages, however this effect was independent of the supernatant stimulation. The adipokines, as leptin and adiponectin, are important factors in the obesity and metabolic syndrome development. Therefore, we analyzed the levels of leptin and adiponectin produced by macrophages during BCG infection. The Leptin levels were not detect, while adiponectin production, was increased in the control macrophages in presence of supernatant, an effect that was inhibited during BCG infection. Thus, our results suggest a modulating effect of secreted factors by adipocytes on the macrophages activation, attributed to the lipid droplets formation, PPAR $\gamma$  expression, cytokines synthesis as TNF- $\alpha$  and IL-10 and a dowmodulation of adiponectin during *M. bovis* BCG, infection.

Keywords: Adipocytes, Macrophages, Lipid Droplets, PPAR $\gamma$ , *Mycobacterium bovis* BCG



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Ocorrência mundial da Obesidade.....	15
<b>Figura 2:</b> Principais eventos ativados durante o processo de diferenciação.....	19
<b>Figura 3:</b> <i>Cross-talking</i> entre macrófagos e adipócitos.....	22
<b>Figura 4:</b> Morfologia dos Corpúsculos Lipídicos.....	31
<b>Figura 5:</b> Modelo de biogênese de Corpúsculos Lipídicos: No modelo atual de formação de CLs, os lipídios neutros são sintetizados entre os folhetos da membrana do RE.....	35
<b>Figura 6:</b> Os heterodímeros TLR2 / CD36 desviam a sinalização intracelular para o aumento da expressão de PPAR $\gamma$ e acumulação de lipídios durante a infecção por <i>M. bovis</i> BCG.....	38
<b>Figura 7:</b> Protocolo de diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3-L1.....	41
<b>Figura 8:</b> Análise do processo de diferenciação celular.....	47
<b>Figura 9:</b> Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 1:1, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-).....	49
<b>Figura 10:</b> Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por <i>M. bovis</i> BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-).....	50
<b>Figura 11:</b> Síntese de TNF- $\alpha$ .....	53
<b>Figura 12:</b> Síntese de IL-10.....	54
<b>Figura 13:</b> Síntese de Adiponectina .....	55
<b>Figura 14:</b> Produção de Nitrito.....	56
<b>Figura 15:</b> Expressão de PPAR $\gamma$ .....	57
<b>Figura 16:</b> Produção de citocinas por adipócitos infectados.....	58
<b>Figura 17:</b> Modulação de macrófagos infectados por fatores solúveis secretados por adipócitos.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

15-LO: 15-lipoxigenase

5-LO: 5-lipoxigenase

ADRP: Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos

Akt: Protein kinase-B

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico AMPc

AP2: Ativador da proteína 2

C/EBP: Proteína de ligação ao intensificador CCAAT

CCR2: Receptor de quimiocina tipo 2

CLs: corpúsculos lipídicos

COX: ciclooxigenase

CRP: Proteína c reativa

DCVs: Doenças cardiovasculares

DEX: Dexametasona

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

eNOS: enzima endotelial NO sintase

EVs: Vesículas extracelulares

FAZ: Ácido graxo sintase

FBS: Soro fetal bovino

FOXO1: Forkhead box protein O1

HIF-1 $\alpha$ : Fator-1 $\alpha$  induzível por hipóxia

HLA-DR: antígeno leucocitário humano

hsCRP: Ensaio altamente sensível da proteína c reativa

IBMX: Metilisobutilxantina

IGF-1: Fator 1 de crescimento insulina semelhante à insulina

IL: Interleucina

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-12p40: Interleucina 12p40

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

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iNOS: Enzima NO

IFN- $\gamma$ : Interferon – gama

IRF: Fator regulatório de interferons

INS: Insulina (Ins),

JNK: Quinase N-terminal de c-Jun

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LO: Lipoxigenase

LPL: Lipase de lipoproteínas

LPS: Lipopolissacarídeo

LTC4: Leucotrieno C4

LXR: Receptor X do fígado

MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos

MOI: Multiplicidade de infecção

MPs: Micropartículas derivadas de adipócitos

MS: Ministério da Saúde

NF-K $\beta$ : Fator nuclear

NLRP3: Receptor NOD like de proteína 3

NO: óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

OMS: Organização Mundial da Saúde

ox-LDL: Lipoproteína de baixa densidade oxidada

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

PAF: Fator ativador de plaquetas PAMP: Padrão molecular associado à patógeno

PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos

PAT: Família composta por perilipina, ADRP e TIP47

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PGE 2: Prostaglandinas 2

PLA2: Fosfolipase A2

PLIN 1: Perilipinas

PPAR $\gamma$ : Receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomos

RANTES: Regulador sob ativação normalmente expressa e secretada por células T

RXR: Receptor X retinóico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SVF: Fração vascular estromal

TAB: Tecido Adiposo Branco

TAGs: Triacilgliceróis

TAM: Tecido adiposo marrom

TGF $\beta$ : Fator de crescimento tumoral

TIP47 Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons

TF: Fatores de transcrição

TLR: Receptor Toll-like

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral – alfa

TZDs: Tiazolidinediones

UFC: Unidade formadora de colônia

TXNIP: Proteína tiorredoxina

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 – Obesidade e Saúde Pública.....	14
1.1.1 – Adipogênese.....	16
1.1.2 – Regulação Transcricional na Adipogênese.....	17
1.1.3 – Perfil macrofágico (M1/M2) durante a Adipogênese.....	19
1.2 – Relações entre o sistema imune e obesidade – metabolismo e inflamação.....	20
1.3 – PPAR $\gamma$ e Metabolismo lipídico.....	26
1.4 – Corpúsculos Lipídicos.....	28
1.4.1 – Características Gerais.....	28
1.4.2 – Biogênese de Corpúsculos Lipídicos.....	32
1.5 – Infecção Micobacteriana.....	35
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 – Objetivo Geral.....	39
2.2 – Objetivos Gerais.....	39
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 – Cultura e Diferenciação de células NIH3t3-L1.....	40
3.2 – Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais.....	41
3.3 – Contagem de células em câmara de Newbauer.....	42
3.4 – Estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos diferenciados.....	42
3.5 – Infecção com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	42
3.6 – Coloração com Oil Red O e contagem de CorpúsculoLipídicos.....	43
3.7 – Aquisição de imagens.....	44
3.8 – Western Blot.....	44
3.9 – Dosagem de citocinas.....	45
3.10 – Dosagem de Nitrito.....	45
3.11 – Análises estatísticas.....	45

<b>4 – RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 – Diferenciação de Adipócitos a partir de células NIH3t3-I1.....	46
4.2 – Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	48
4.3 – Produção de citocinas em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	52
4.4 – Produção de adipocinas em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	55
4.5 – Produção de nitrito em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	56
4.6 – Expressão de PPAR $\gamma$ em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	57
4.7 – Produção das citocinas tnf- $\alpha$ e il-10 em adipócitos infectados.....	58
<b>5 – DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>6 – CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – OBESIDADE E SAÚDE PÚBLICA

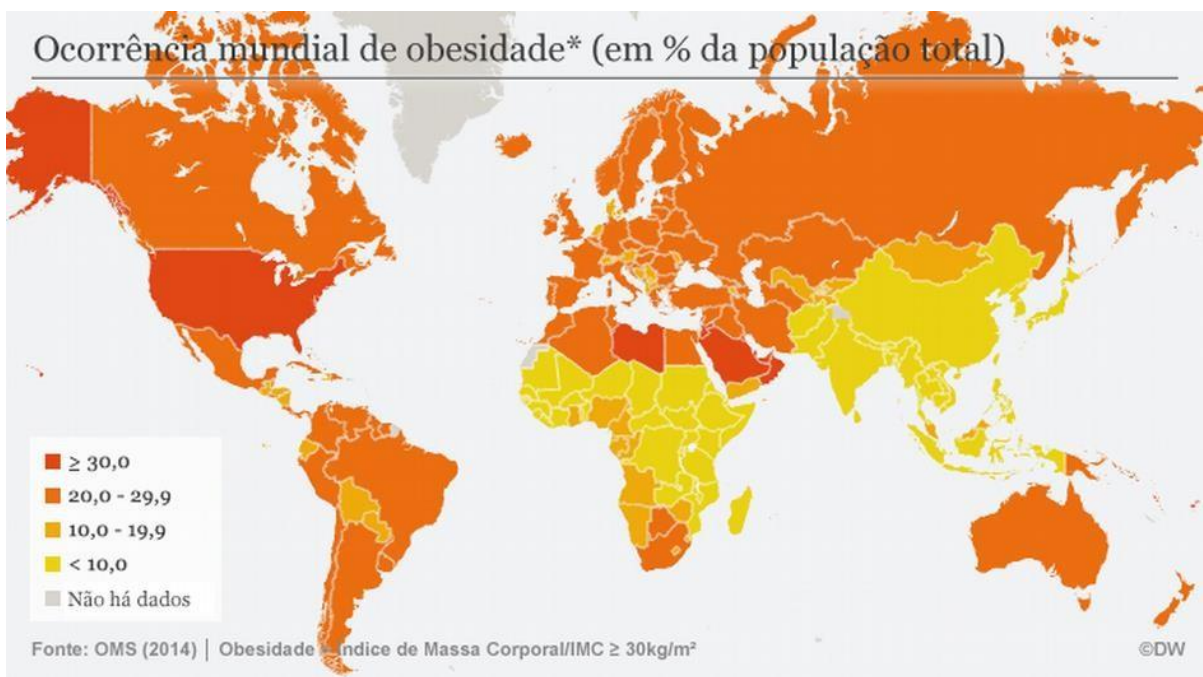
A obesidade é atualmente considerada uma doença crônica multifatorial caracterizada pelo excesso de gordura corporal que pode prejudicar a saúde (Who, 2015), e por um estado inflamatório de baixo grau, conhecido como metainflamação (Gregor e Hotamisligil, 2011). Este estado inflamatório é resultado da ativação duradoura do sistema imune, através do recrutamento de células imunes para o tecido adiposo e da produção de uma série de citocinas ou adipocinas pelo tecido adiposo branco (TAB), envolvidas nesse processo inflamatório (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Considerada uma pandemia do século XX, esta é uma doença conhecida por ser um dos principais problemas de saúde pública mundial (Ogden et al. 2014; Popkin et al. 2006). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2014), 1,9 bilhões (39%) de adultos acima dos 18 anos estavam com sobrepeso (Figura 1), dentre esses, mais de 600 milhões (13%) eram obesos. Em relação à obesidade infantil (2013), 42 milhões de crianças estavam com sobrepeso ou com obesidade (WHO, 2014). No Brasil, a taxa de obesidade está estável, porém o número de brasileiros acima do peso é cada vez maior. De acordo com o Ministério da Saúde, os índices de sobrepeso e obesidade cresceram de 43% e 11,9% em 2006 para 52,5% e 17,9% em 2014, respectivamente (MS, 2014). Outro dado preocupante é o fato da obesidade ser um fator de risco para doenças como Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão e doenças cardiovasculares (DCVs) que correspondem a 72% dos óbitos no Brasil (MS, 2015).

Apesar da atual conscientização sobre os riscos da obesidade, sua incidência continua a aumentar (Varela and Horvath 2012). Atualmente, sabe-se que há uma tendência crescente em países em desenvolvimento (Ogden et al. 2014; Popkin et al. 2006; Varela and Horvath 2012). A adoção de estilos de vida relativamente sedentários, em conjunto com uma dieta rica em energia, contribuem diretamente com a incidência de certas doenças metabólicas relacionadas à resistência à insulina e problemas cardiovasculares (Ogden et al. 2014; Popkin et al. 2006; Kahn et al. 2000; Wohlers et al. 2003; Warensjö et al. 2006; Blanquer-Rosselló et al. 2015; Wei et al. 2016).

A obesidade resulta de um prolongado balanço energético positivo, ou seja, uma ingestão contínua de calorias que excede significativamente o gasto energético. O ganho de peso na obesidade é principalmente uma consequência do acúmulo de ácidos graxos da dieta ou a partir de lipogênese *de novo* (via enzimática de conversão de carboidratos a gordura).

Nos seres humanos, o TAB responde a um fornecimento excessivo de ácidos graxos através da hipertrofia – aumento em tamanho de gotículas de gordura, também conhecidas como gotas lipídicas ou corpúsculos lipídicos (CLs), e em menor extensão, por meio da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, a hiperplasia (Spalding et al. 2008). Juntos, estes dois processos caracterizam a adipogênese, isto é a geração de adipócitos a partir de células precursoras.



**Figura 1: Ocorrência mundial da Obesidade.** Os dados foram fornecidos pela Organização Mundial da Saúde em 2014, e os valores são expressos com base na porcentagem da população total.

No entanto, apesar do impacto da obesidade em doenças metabólicas e cardiovasculares ser bem conhecido, seu papel nas funções de ativação do sistema imune no curso de doenças infecciosas é pouco compreendido. Portanto, é importante elucidar os sinais responsáveis pela interação e comunicação entre macrófagos e adipócitos, além de desvendar os mecanismos e processos inflamatórios envolvidos.



### 1.1.1– ADIPOGÊNESE

A adipogênese é um processo altamente controlado, caracterizado pela geração de adipócitos a partir de células precursoras. Esse processo envolve mudanças não só no fenótipo das células em questão, como também no seu metabolismo, ciclo celular, fisiologia e ativação gênica específica.

O modelo de estudo do processo de adipogênese mais bem caracterizado utiliza pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 e um coquetel de estimulantes constituídos classicamente por insulina (Ins), dexametasona (Dex), metilisobutilxantina (IBMX) e soro fetal bovino (FBS) que juntos desencadeiam o processo de adipogênese (Ntambi et al. 2000).

Em mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo com diferentes funções e propriedades: O tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), os dois envolvidos com o balanço energético do indivíduo. Enquanto a função do TAM é dissipação de energia na forma de calor, processo que ocorre na termogênese induzida por frio e dieta, o TAB está relacionado na estocagem de energia na forma de triacilgliceróis, sendo este o principal reservatório energético do organismo. Neste tecido, podem ser encontrados adipócitos, que são o tipo celular predominante, pré-adipócitos (células precursoras de adipócitos), células endoteliais, células do estroma vascular, fibroblastos, leucócitos e macrófagos (Coleman et al. 2004).

Em torno de 15% a 50% das células do tecido adiposo constituem um reservatório de células-tronco mesenquimais, que incluem pré-adipócitos e são capazes de se dividir e se diferenciar em resposta a vários estímulos extracelulares. Essas células, entretanto, possuem uma capacidade muito limitada de sintetizar e estocar lipídios neutros (Coleman et al. 2004). A expansão do TAB durante a obesidade infantil também resulta da combinação de ambos – hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Em adultos, adipócitos exibem renovação notavelmente intensa e constante, persistindo por toda vida (Spalding et al. 2008).

A diferenciação ou adipogênese, compreende a fase inicial, intermediária e terminal. Adipócitos maduros, provém de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo, tornando-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e tornam-se “comprometidas” com a linhagem adipocítica. Os pré-adipócitos adquirem as

características de adipócitos maduros, acumulando gotas lipídicas e a habilidade de responder a hormônios como a insulina (Nelson e Cox, 2014).

O conhecimento sobre a adipogênese aumentou bastante nas últimas duas décadas, com o uso de células clonais e não clonais precursoras de adipócitos provenientes de roedores e humanos. Glicocorticoides, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) foram identificados como os mais eficientes agentes adipogênicos em experimentos *ex vivo* (Ailhaud et al. 2004) e além disso, a ativação de vários eventos transcricionais em cascata são observados durante a diferenciação.

### 1.1.2 – REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL NA ADIPOGÊNESE

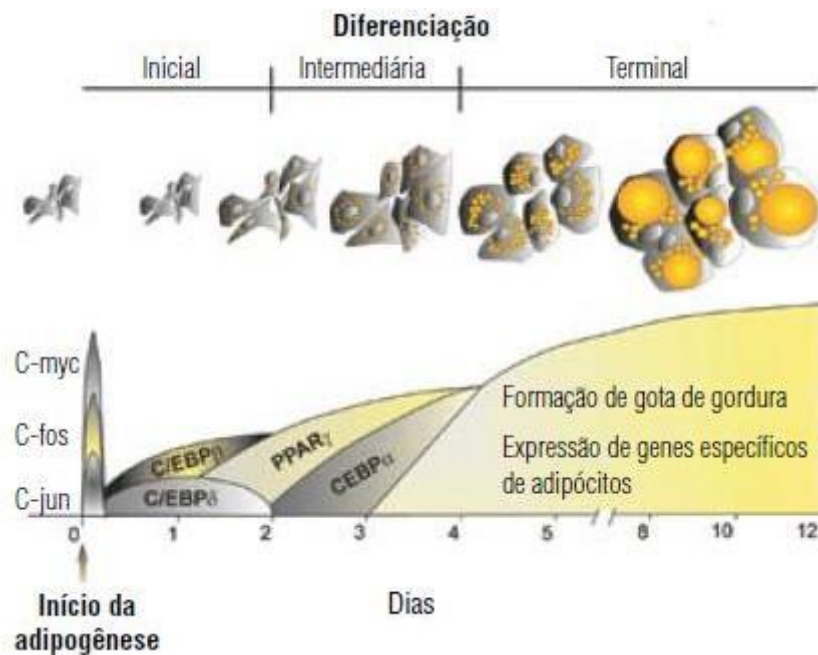
O processo de diferenciação compreende estágios bem controlados que incluem expansão clonal, parada do ciclo celular e diferenciação, onde vários genes que estavam silenciados passam a ser ativados. A partir da administração *in vitro* do coquetel estimulante, descrito acima, os pré adipócitos são ativados, a partir da ativação do receptor de glicocorticoides (pela dexametasona), do receptor de IGF-1 (pela insulina) e da via de sinalização da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) (pelo IBMX, um inibidor de fosfodiesterases). Com isso os eventos iniciais do processo de diferenciação são ativados, representados pela expressão das proteínas de ligação ao intensificador CCAAT (C/EBPs): C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$ . As células, então, reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do processo de ciclo celular e entram em diferenciação terminal por ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gamma – (PPAR) $\gamma$  e C/EBP- $\alpha$ , os dois reguladores centrais do processo adipogênico (Farmer et al. 2006).

Perante a confluência, os pré-adipócitos expressam marcadores muito precoces de diferenciação, como lipase de lipoproteínas (LPL) e colágeno tipo VI, a qual é induzida pelo contato célula-célula. Após adição do coquetel, ocorre a expressão transiente de proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *myc*, que dão início a mitose pós-confluente, importante para que ocorra o desenovelamento das hélices de DNA, permitindo o acesso de fatores de transcrição a elementos responsivos presentes em genes-alvos envolvidos na modulação do fenótipo do adipócito maduro, cuja expressão cessa entre duas e três horas depois do tratamento (White and Stephens 2010).

C/EBP- $\beta$  e - $\delta$  são os primeiros fatores de transcrição induzidos após a exposição das células ao coquetel de diferenciação – de forma que é postulado o fato de estarem diretamente envolvidos no processo de diferenciação, em resposta a indutores hormonais. A expressão do C/EBP- $\delta$  cessa após 48 horas, enquanto que o declínio do C/EBP- $\beta$  é mais gradual – por volta do oitavo dia pós-diferenciação (White and Stephens 2010). C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  ativam a expressão de PPAR $\gamma$ , que é transcricionalmente induzida durante o segundo dia pós-indução da diferenciação, sendo máxima por volta do terceiro ou quarto dia. C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  também induzem a expressão de C/EBP- $\alpha$ , que chega a expressão máxima entre o quarto e o quinto dia da diferenciação. Uma vez ativados os reguladores centrais da adipogênese, C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , estes se autorregulam positivamente para se manterem expressos, ou seja, retroalimentam a indução da sua própria expressão, apesar da redução da expressão de C/EBP- $\beta$  e - $\delta$  (Figura 2). C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$  induzem transcrição de mais de uma centena de genes-alvos anteriormente silenciados, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e na manutenção do fenótipo do adipócito, como aquelas envolvidas no transporte de glicose sensível a insulina, lipogênese, lipólise e síntese e secreção de adipocinas. Os dois fatores são críticos e decisivos para os estágios tardios de diferenciação de maneira cooperativa e sinérgica, mas não são expressos em altos níveis nos pré-adipócitos e não estão envolvidos no desenvolvimento inicial (Lefterova et al. 2014).

Em adição aos C/EBPs e PPAR $\gamma$  (fatores integrados a uma rede transcricional controladora da adipogênese), outros fatores também regulam esse processo. Em roedores e humanos, ácidos graxos de cadeia longa atuam no estágio inicial e induzem a formação dos adipócitos (White and Stephens 2010). TNF- $\alpha$  também é responsável pela inibição da expressão de PPAR $\gamma$  em vários estágios, incluindo a transcrição, estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) e síntese protéica (Guilherme et al. 2008; Tang et al. 2006).

Além da ativação gênica e fatores transcricionais específicos, adipócitos gerados a partir do processo de adipogênese podem interferir na diferenciação de monócitos em macrófagos característicos do tecido adiposo (como a partir de vesículas extracelulares liberadas por adipócitos) e na polarização macrofágica, onde marcadores de macrófagos de perfil M1 são observados, contribuindo dessa forma, com o estado de inflamação metabólica, ou metainflamação, observado na obesidade.



**Figura 2: Principais eventos ativados durante o processo de diferenciação.** Na diferenciação terminal, quando ocorre a formação de “gotículas de gordura”, alguns genes como PPAR $\gamma$  são expressos. Uma vez ativados, esse fator central da adipogênese se autorregula positivamente, para manter sua expressão gênica. PPAR $\gamma$  induz a transcrição de genes do adipócitos, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e manutenção do fenótipo dessas células (Queiroz et al. 2009).

### 1.1.3 – PERFIL MACROFÁGICO (M1/M2) DURANTE A ADIPOGÊNESE

O PPAR $\gamma$  é o primeiro fator de transcrição, que é expresso em altos níveis no tecido adiposo (Chawla et al. 1994; Tontonoz et al. 1994). O impedimento de sua transcrição por FOXO 1 (*Forkhead box protein O1*) regula negativamente a adipogênese. O PPAR $\gamma$  expresso por adipócitos é um determinante do fenótipo de macrófagos no tecido adiposo (Charo, 2007). Sua deficiência favorece a expressão de macrófagos M1 e prejudica a expressão de marcadores de macrófagos M2 no tecido adiposo (Bassaganya-Riera et al., 2009). Neste caso, os macrófagos pró-inflamatórios suprimem a atividade de PPAR $\gamma$  em adipócitos (Yin et al., 2015). Na verdade, a obesidade é acompanhada por uma transformação nos estados polarizados de macrófagos de perfil anti-inflamatório M2 “alternativamente ativados” (Kosteli et al., 2010), para um perfil pró-inflamatório M1 “classicamente ativados”

(Lumeng et al. 2007a). O principal gatilho para o recrutamento dos macrófagos M1 é sugerido ser a secreção de TNF- $\alpha$  a partir de adipócitos hipertrofiados (Wellen e Hotamisligil 2003). O fator regulador de interferon 5 (IRF 5) é um importante mediador de polarização M1 dependente de TLR (Krausgruber et al. 2011 enquanto que, IRF4 é um fator de transcrição que controla a polarização M2 (Satoh et al., 2010).

No entanto, os estágios iniciais da expansão do tecido adiposo são caracterizados por macrófagos de tecido adiposo polarizado em M2 e acúmulo lipídico progressivo (Prieur et al., 2011). A progressão da obesidade induzida pela dieta hipercalórica aumenta o número de macrófagos M1 em 65 vezes, enquanto o número de macrófagos M2 é aumentada apenas em seis vezes (Fujisaka et al., 2009). Uma maior expressão de marcadores de macrófagos M2, assim como de marcadores anti-inflamatórios, CD163 e Interleucina 10 (IL-10), e uma redução relativa de marcadores pró-inflamatórios são particularmente observados em áreas fibróticas (Spencer et al., 2010). Macrófagos do tecido adiposo de camundongos magros expressam muitos genes que apresentam características de M2 ou macrófagos "alternativamente ativados", incluindo arginase 1 e interleucina-10 (IL-10). A obesidade induzida pela dieta diminui a expressão desses genes em macrófagos de tecidos adiposos enquanto aumenta expressão de genes como aqueles que codificam TNF- $\alpha$  e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que são características de macrófagos M1 ou "classicamente ativados" (Lumeng et al. 2007). Na verdade, o TNF- $\alpha$  é uma citocina importante derivada de macrófagos mediadora da inflamação, enquanto que os ácidos graxos livres são importantes mediadores da inflamação derivados de adipócitos. Mudanças no tecido adiposo durante a inflamação metabólica também incluem expressão em macrófagos de alguns produtos genéticos característicos de adipócitos, como o ativador da proteína 2 (AP2), enquanto que os adipócitos secretam produtos de genes característicos de macrófagos tais como IL-6 ou TNF- $\alpha$ .

## **1.2 – RELAÇÕES ENTRE O SISTEMA IMUNE E OBESIDADE – METABOLISMO E INFLAMAÇÃO**

A visão tradicional do tecido adiposo como um depósito de lipídios tem sido contestada desde a descoberta de algumas moléculas bioativas produzidas nele, como o fator endócrino adiposina (Flier et al. 1987). A identificação da leptina, uma

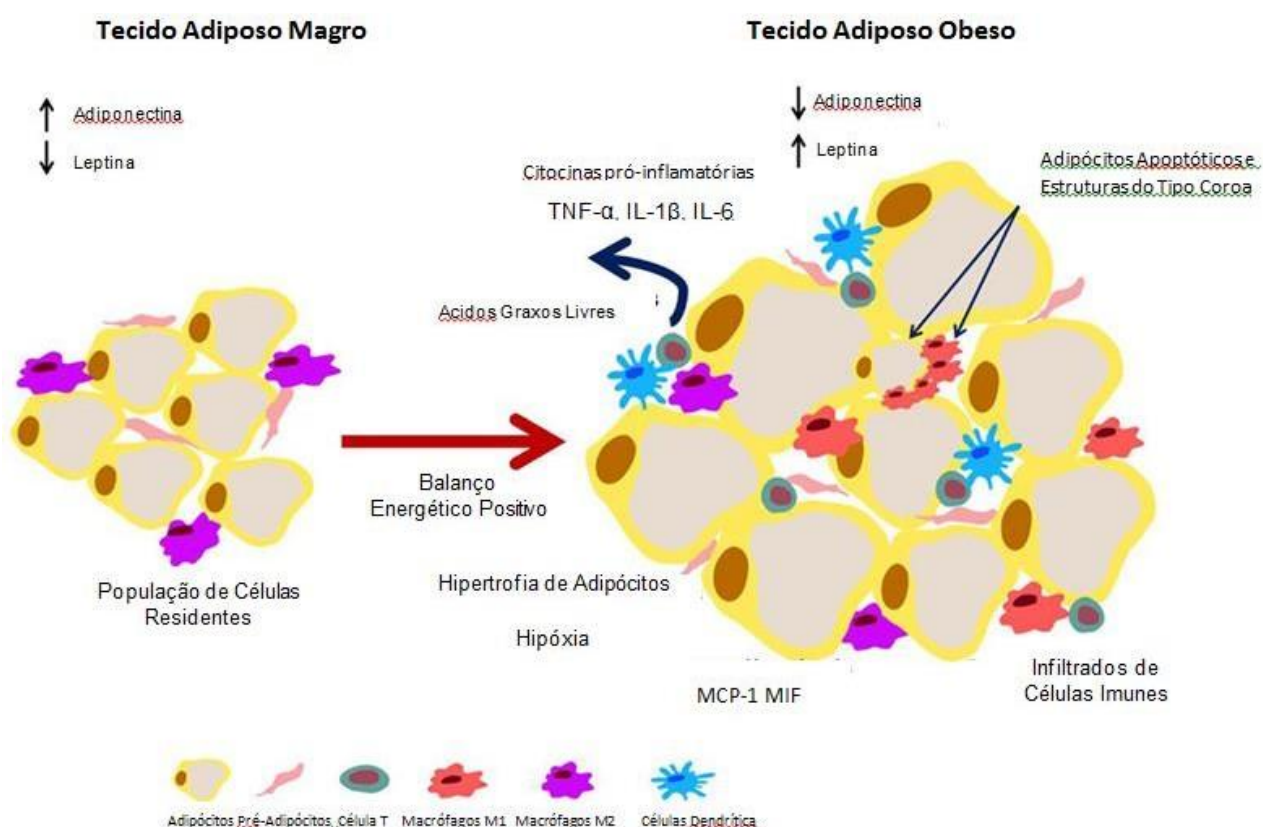
adipocina com efeitos centrais no hipotálamo, em 1994, estabeleceu definitivamente esse tecido como um órgão endócrino (Lafontan et al. 2005).

O tecido adiposo é uma variedade especial de tecido conjuntivo no qual se encontra o predomínio de células adiposas (adipócitos). Localizado principalmente na hipoderme, o tecido adiposo modela a superfície do corpo e ajuda no isolamento térmico (mau condutor de calor) do organismo. Como funções principais estão a de secretar as quantidades apropriadas de adipocinas e a de reduzir a circulação de ácidos graxos livres, estocando-os na forma de triacilgliceróis em seus corpúsculos lipídicos (Lafontan et al. 2005, Amitani et al. 2013).

O ganho de peso corporal devido ao consumo de dietas hipercalóricas leva a uma sobrecarga metabólica, com aumento de triglicerídeos e glicose no sangue. Em um estado de sobrecarga metabólica, onde a ingesta alimentar supera o gasto energético, o organismo tenta equilibrar este desbalanço, secretando insulina, estocando lipídios no tecido adiposo e oxidando ácidos graxos no músculo (Hotamisligil 2006). Mantida a sobrecarga, fatores como a lipotoxicidade dos ácidos graxos em excesso, a ativação de macrófagos residentes e a secreção de quimiocinas e citocinas, levam ao recrutamento de células do sistema imune para o tecido adiposo. Desse modo, processos inflamatórios são então desencadeados, ocorrendo o recrutamento de mais macrófagos e outras células do sistema imune para o local, induzido pela secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas por adipócitos e macrófagos residentes, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas como a MCP-1 (Hotamisligil 2006; Hellmann et al. 2013; Ray et al. 2016; Guilherme et al. 2008) (Figura 3). Essa sobrecarga é compensada pelo aumento da produção de insulina pelo pâncreas, estocagem de lipídios no tecido adiposo e oxidação de ácidos graxos no músculo (Hotamisligil, 2006).

A glicotoxicidade e a lipotoxicidade induzem uma característica proinflamatória em macrófagos que residem ou invadem o tecido adiposo e vasculatura, sendo responsáveis por efeitos oxidativos e estresse do retículo endoplasmático (Nguyen et al. 2007; Vandanmagsar et al. 2011). Isso, por sua vez, provoca a ativação da proteína tiorredoxina (TXNIP) e da família NLR – que ativam o inflamassoma NLRP3, aumentando a liberação de IL-1 $\beta$  na sua forma ativa (Zhou et al. 2010; Dinarello et al. 2009). A inflamação amplificada por IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de várias citocinas e quimiocinas, e favorece o recrutamento de mais macrófagos para o tecido adiposo e vasos sanguíneos (Vandanmagsar et al. 2011; Kim et al. 2006). Além disso,

alterações na microbiota intestinal juntamente ao aumento da vazão intestinal de lipopolissacarídeos de paredes bacterianas (endotoxinas) podem promover ainda mais a inflamação do tecido. Endotoxinas, ácidos graxos livres e colesterol induzem inflamação ativando as vias do receptor Toll-like (TLR) e, posteriormente, o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). (Nguyen et al. 2007; Vandanmagsar et al. 2011).



**Figura 3: Cross-talking entre macrófagos e adipócitos.** Diante de um balanço energético positivo, ou seja quando a ingesta alimentar supera o gasto energético, células residentes do tecido adiposo como macrófagos e adipócitos, são responsáveis pela secreção de diversos fatores solúveis que recrutam mais macrófagos para o tecido adiposo e amplificando o processo de metainflamação. Adaptado de: <http://clinicascaiologacao.blogspot.com.br/>

As interações locais entre macrófagos e outros tipos de células estão bem documentados em determinadas condições patológicas, tendo-se sugerido que infecções crônicas de baixo grau, como infecção intestinal e doença periodontal desempenham um papel importante na patogênese de distúrbios metabólicos tais como diabetes e subsequentes riscos vasculares (Cani et al. 2007; Nishimura et al.

2007; Gy et al. 1998; Suganami et al. 2001). Já é estabelecido que a maioria dos indivíduos obesos apresentam níveis elevados da proteína C-reativa (CRP), indicadora de fase inflamatória aguda, medida por ensaio altamente sensível (hsCRP) (Nishimura et al. 2002). Estudos recentes têm demonstrado que macrófagos co-cultivados com adipócitos e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), produziram níveis mais elevados de IL-6, bem como de MCP-1, podendo explicar os níveis elevados de proteína C-reativa (CRP), indicadora de fase inflamatória aguda, medida por ensaio altamente sensível em indivíduos obesos (Yamashita et al. 2010). Esses dados suportam a hipótese de que o tecido adiposo pode desempenhar um papel importante na amplificação da inflamação e a interação adipócitos-macrófagos desempenha um papel fundamental. No entanto, ainda não está claro por quais motivos essa inflamação de baixo grau induzida por infecção é amplificada, influenciando em transtornos metabólicos sistêmicos.

Alguns estudos vêm contestando a ideia de que a interação entre adipócitos e macrófagos fornece um perfil pró-inflamatório de macrófagos no tecido adiposo obeso. A redução de interleucina 12p40 (IL-12p40) por macrófagos estimulados com LPS, em meio condicionados de adipócitos foi observada enquanto que a produção de outras citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  permaneceu praticamente inalteradas. Entre os lipídios identificados, prostaglandinas 2 (PGE<sub>2</sub>), ácidos linoleicos e ácidos oleico foram potentes inibidores da secreção de IL-12p40 (Inge et al. 2017). Além disso, foi observado que houve um aumento da expressão dos marcadores de macrófagos M1 CD16 e antígeno leucocitário humano (HLA-DR), enquanto que as percentagens de células positivas para marcadores M2, CD206 e CD163, não foram afetados, indicando uma possível discrepância entre os efeitos imunomoduladores em humanos em comparação com camundongos (Lolme`de et al. 2011; Mestas et al. 2004). Esses resultados forneceram as primeiras evidências de que a obesidade leva a alterações no fenótipo de macrófagos que poderiam ser mediadas por lipídios derivados de adipócitos em seres humanos.

Outra característica da interação adipócitos-macrófagos, revelou a ingestão de lipídios por macrófagos (Lindsey et al. 2014). De acordo com Lindsey et al. 2014 e Cinti et al. 2005, os macrófagos têm mecanismos para absorver lipídios no tecido adiposo. Além disso, os mesmos estudos sugerem que lipídios residuais associados a adipócitos necróticos, fragmentam-se em gotículas lipídicas menores que podem ser fagocitadas por macrófagos (Lindsey et al. 2014 e Cinti et al. 2005). Além de aderirem



a adipócitos ou gotículas lipídicas, observou-se que os macrófagos formam contatos uns com os outros quando envolvem os adipócitos muito maiores, sendo observadas células gigantes multinucleares encontradas em distúrbios granulomatosos (Okamoto et al. 2003).

Além disso, Vesículas Extracelulares (EVs) liberadas por adipócitos humanos ou por explantes de tecidos adiposos desempenham um papel na interação parácrina entre adipócitos e macrófagos, um mecanismo chave na inflamação do tecido adiposo que leva a complicações metabólicas como resistência à insulina. As vesículas adipocíticas diferenciaram monócitos em macrófagos característicos de tecido adiposo, definidos pela liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (Mariette et al. 2014). Além disso, macrófagos pré-estimulados com vesículas interferiram na sinalização de insulina em adipócitos humanos e resultaram num fenótipo mais pró-inflamatório, principalmente quando na presença de adiponectina, sugerindo um possível papel para as vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo humano em um ciclo pró-inflamatório recíproco entre adipócitos e macrófagos, com potencial para agravar a resistência à insulina local e sistêmica (Mariette et al. 2014).

Vários peptídeos bioativos liberados pelo tecido adiposo também já foram descritos, alguns deles capazes de atuar como hormônios (Lafontan et al. 2005). A maioria dessas proteínas, comentadas a seguir, é produzida e secretada exclusivamente pelo tecido adiposo. Entre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adipsina, a resistina, o TNF- $\alpha$ , o Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), o fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), a MCP-1 e a visfatina, entre outros. Com exceção da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores tendem a intensificar com a obesidade (Suganami et al. 2017; Paniagua 2016, Frühbeck et al. 2001, Maury and Brichard 2010), sendo muitos deles, como o TNF- $\alpha$ , a resistina, o PAI-1, a IL-6 e a MCP-1, diretamente associados a indução de resistência a insulina, a hipercoagulabilidade e a aterogênese, que, por sua vez, geram hipertensão, intensificam estados pró-inflamatórios, aumentam riscos cardiovasculares e acidentes tromboembólicos (Hauer et al. 2004).

O TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas secretadas durante a obesidade, é um indutor de lipólise em indivíduos obesos e inibidor da síntese lipídica (Guilherme et al. 2008; Greenberg et al. 2011). Pode ser secretado juntamente a IL-6 por macrófagos

infiltrados no tecido adiposo hipertrofiado, sendo este um aspecto importante no desenvolvimento da síndrome metabólica, pois potencializa a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Paniagua 2016; Hotamisligil 2006; Maury and Brichard 2010; Guilherme et al. 2008). Portanto, o TNF- $\alpha$  pode contribuir para o aumento de ácidos graxos circulantes, levando ao acúmulo de triglicerídeos e lipídios ativados ectopicamente em hepatócitos, células  $\beta$  e células musculares, o que induz estresse e disfunção nessas células. (Guilherme et al. 2008; Greenberg et al. 2011). Alterações inflamatórias na obesidade também são notáveis dentro de depósitos de gordura visceral. A análise dos perfis de expressão gênica e adipócitos e da fração vascular estromal (SVF), obtidos de camundongos obesos e humanos revelou que os macrófagos produzem quase todo o TNF- $\alpha$ , enquanto que os adipócitos maduros secretam a maioria da leptina. Os níveis de IL-6 é expressa igualmente entre adipócitos, macrófagos e células do SVF (Weisberg et al. 2003). Tais observações sugerem que os macrófagos infiltrados no tecido adiposo contribuem para a elevação de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6, sendo estes, marcadores comuns na obesidade (Weisberg et al. 2003).

No tecido adiposo, células-tronco mesenquimais podem ser isoladas e direcionadas para diversas linhagens celulares, incluindo miócitos, condrócitos, osteoblastos e adipócitos (Zuk et al. 2001). O aumento da massa adiposa durante a obesidade é determinado pelo aumento em tamanho e número de adipócitos. Alterações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem devido à ativação de suas ações metabólicas típicas: lipogênese e a lipólise. Quando o aumento em diâmetro dos adipócitos atinge um grau máximo e a capacidade de armazenamento de gordura se exaure, novas células são recrutadas para esse tecido. Adipócitos muito grandes podem perder a capacidade de estocagem de gordura e tornam-se mais lipolíticos. Isso resulta no aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma e danifica a função de órgãos não adiposos, num processo identificado como lipotoxicidade (DeFronzo et al. 2004). Adipócitos maduros são naturalmente protegidos dessa lipotoxicidade em virtude de sua alta capacidade de detoxificação de ácidos graxos. Essas modificações podem ser reguladas conforme a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que também varia de acordo com o estado nutricional, gasto energético, a influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), atividade de enzimas envolvidas nestes processos e heterogeneidade característica existente entre os diversos grupamentos adiposos do organismo.

Além da obesidade ser marcada por fenômenos relacionados com interações entre macrófagos e adipócitos como a inflamação metabólica ou metainflamação, ativação macrofágica por fatores secretados por adipócitos, como vesículas extracelulares (EVs) liberadas por adipócitos e por um estado de transformação nos estados polarizados de macrófagos, fatores de transcrição com propriedades imunorregulatórias estão envolvidos em processos inflamatórios e na adipogênese.

### **1.3 – PPAR $\gamma$ E METABOLISMO LIPÍDICO**

Estudos que compreendem a identificação e caracterização de PPAR $\gamma$  foram essenciais para a compreensão da fisiologia do tecido adiposo. Este receptor pode regular muitos processos biológicos, além do metabolismo lipídico, como a homeostase da glicose, inflamação e aterogênese (Koutnikova et al. 2003), sendo também um regulador central da adipogênese, conforme demonstraram estudos sobre a perda de função em células fibroblásticas (Wu et al. 2000). Nesses estudos, PPAR $\gamma$  é essencial para a diferenciação de adipócitos (Wu et al. 2000), sugerindo que um ativador endógeno de PPAR $\gamma$  é produzido durante a adipogênese (Tzamelis et al. 2004). No entanto, a identidade de ligantes biológicos para PPAR $\gamma$  permanece não esclarecida, sendo esta uma área de investigação intensa.

PPAR $\gamma$  é um membro da família dos Receptores Nucleares ativados por lipídios, (Zingarelli, 2003), originalmente descrito junto às demais classes de PPARs em adipócitos, monócitos e macrófagos, com papel chave na resposta de proliferação de peroxissomos (Issemann and Green, 1990). Hoje se sabe que também está presente em outras células do sistema imune de origem hematopoiética, incluindo linfócitos T, linfócitos B, células NK, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, onde um papel para estes receptores na inflamação e na imunorregulação foi proposta (Zingarelli, et al. 2003). Os PPARs atuam em processos inflamatórios e imunoregulatórios devido à propriedade de regular a expressão de vários genes implicados na patofisiologia da aterosclerose, inflamação, obesidade, diabetes e resposta imune (Ricote et al., 1998; Tontonoz, 1998; von Knethen et al., 2007). Seu papel na homeostase e metabolismo lipídico é observado principalmente em macrófagos espumosos em lesões ateroscleróticas (Ricote et al., 1998; Tontonoz, 1998).

Este receptor é ativado por ligantes lipídicos e regula diretamente a expressão de vários genes, que participam na captação de ácidos graxos, metabolismo de lipídios, funções imunes e diversos aspectos da reprodução, desenvolvimento, homeostasia e funções imunes (Francis et al., 2003). A partir da ligação ligante-receptor, o PPAR $\gamma$  se heterodimeriza com o receptor retinóide x (RXR) e se liga a regiões promotoras específicas de genes-alvo no DNA, atuando como fator de transcrição (Schoonjans et al., 1997; Khan and Vanden Heuvel, 2003). Após se heterodimerizarem com (RXR), recrutam complexos de proteínas que se constituem de co-ativadores ou co-repressores para ativação ou repressão transcricional, respectivamente. Uma vez formado, o heterodímero reconhece a região do elemento de resposta PPRE, localizado no promotor do gene alvo (Schoonjans et al., 1996). O PPAR $\gamma$  também pode reprimir genes inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias e NO sintase induzível, por meio da transrepressão de genes alvos do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Chinetti et al., 2000). Estas observações sugerem a participação de PPARs não somente no metabolismo de lipídios como também no controle da inflamação.

PPAR $\gamma$  é encontrado sob dois subtipos: PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2. PPAR $\gamma$ 2 é encontrado quase exclusivamente em adipócitos, enquanto que o PPAR $\gamma$ 1 é encontrado em vários tecidos (Ricote et al., 1999). PPAR $\gamma$  é predominantemente expresso em monócitos ativados e macrófagos de tecidos *in vivo*, incluindo células espumosas de lesões ateroscleróticas (Ricote et al., 1998; Tontonoz, 1998), mas também é encontrado em outras células do sistema imune como células dendríticas (Szatmari et al., 2007), células musculares do epitélio gastrointestinal, osteoblastos e osteoclastos (Heikkinen et al., 2007). Apesar de muitas funções serem propostas para PPAR $\gamma$  em macrófagos, o verdadeiro papel deste fator de transcrição na fisiologia e ativação dos macrófagos não é completamente conhecido.

O papel dos PPARs na diferenciação de macrófagos e acúmulo de lipídios intracelular tem sido documentado (Nagy et al., 1998; Tontonoz, 1998). Ligantes específicos de PPAR $\gamma$  potencializam a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por oxLDL, agonistas de PAF e G-CSF, juntamente à expressão de CD36 na membrana celular, sugerindo que PPAR $\gamma$  tem um papel fundamental na regulação da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (de Assis et al., 2003; Inazawa et al., 2003). Já foi relatado que a ativação de PPARs aumenta a transcrição de todos os genes que codificam as proteínas PAT, com exceção da TIP47. As proteínas PAT, podem compartimentalizar ácidos graxos esterificados nos corpúsculos lipídicos, para

posterior liberação de ligantes para os PPARs (Wolins e et al., 2006b). Além disso, os PPARs podem também controlar a transcrição da ADRP em camundongos e humanos (Edvardsson et al., 2006; Motomura e et al., 2006).

Além disso, patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG, descrito posteriormente, sobrevive e replica no interior de células do sistema imune, como os macrófagos, induzindo um mecanismo de escape a partir da regulação da formação de corpúsculos lipídicos mediada pela via de sinalização celular do receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Almeida et al. 2009, Almeida et al. 2014).

## **1.4 – CORPÚSCULOS LIPÍDICOS**

### **1.4.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS**

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas altamente dinâmicas, com função ativa no metabolismo e estoque de lipídios para geração de energia, síntese de membrana, síntese de mediadores inflamatórios, sinalização celular e inflamação (Bozza et al., 2011; Farese e Walther, 2009; Fujimoto et al., 2008). São compostos por lipídios neutros, como triacilglicerol, diacilglicerol e ésteres de colesterol e distribuem-se pelo citoplasma de diversos organismos e tipos celulares, incluindo plantas, fungos e procariotos (Tauchi-Sato et al., 2002; D'Ávila et al, 2006; Bozza et al., 2011). O tamanho dos corpúsculos lipídicos varia de 0,5  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  ou pouco mais, como é o caso de adipócitos que apresentam corpúsculos lipídicos preenchendo todo o citoplasma da célula (Walther e Farese, 2012; Mahajan et al, 2015). Sua morfologia apresenta certa heterogeneidade a nível ultraestrutural variando de fortemente de elétron-densos a elétron-lúcidos de acordo com o tipo celular e o estado de ativação (Figura 4).

Existem algumas limitações metodológicas para o seu estudo e identificação pela microscopia convencional, devido à possibilidade de serem destruídos por fixação e coloração com os reagentes à base de álcool. Os aspectos relacionados à estrutura e função variam de acordo com o tipo de leucócitos, estado de ativação e ambiente inflamatório (Melo et al, 2011; Bozza et al., 2007).

Diferentemente das demais organelas que possuem bicamada lipídica, os corpúsculos lipídicos são constituídos por uma monocamada de fosfolipídios, que os

delimita juntamente a proteínas (Tauchi-Sato et al. 2002). Esta organização única desafia a compreensão de como ocorrem as vias de transporte de proteínas e lipídios, uma vez que o arranjo não se encaixa nos mecanismos clássicos de transporte vesicular. Por outro lado, favorece a sua distinção de outras organelas sob o microscópio eletrônico de transmissão (Melo et al., 2011).

Várias espécies de lipídios foram identificadas nos CLs, presentes em maiores ou menores quantidades. Em adipócitos, os triacilgliceróis (TAGs) são largamente dominantes, enquanto que em macrófagos espumosos, colesterol ésteres são mais abundantes (Bartz et al., 2007a; Grillitsch et al., 2011). Uma variada gama de proteínas está associada à superfície dos CLs através de porções moleculares de natureza anfipática e/ou hidrofóbica (Boulant et al., 2006; Bussell e Eliezer, 2003) e outras foram detectadas no seu núcleo lipídico hidrofóbico (Robenek et al., 2009, 2005). O grupo mais abundante e bem caracterizado de proteínas associadas com os CLs são as denominadas família PAT e, por conseguinte, são frequentemente utilizados como marcadores moleculares destas organelas (Bickel et al., 2009; Brasaemle, 2007).

As principais proteínas PAT descritas relacionadas aos corpúsculos lipídicos compreendem as perilipinas (PLIN 1), que constituem o conteúdo protéico dos corpúsculos lipídicos e têm sido relacionadas na montagem, estocagem, biogênese e metabolismo dos corpúsculos lipídicos, ADRP (Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos) – atualmente denominada PLIN 2, TIP47 (PLIN 3 – Proteína de interação de porção terminal de 47kDa), S3-12 e OXPAT (Skinner et al, 2013; Arrese, Saudale e Soulages, 2014; Mahajan et al, 2015). Perilipina é a proteína mais abundante em CLs de adipócitos e atua regulando mecanismos de lipólise. Em condições basais, a perilipina protege os CLs da ação das lipases, mas em resposta à estimulação hormonal, como glucagon e epinefrina, esta proteína é fosforilada por cinases A dependente de AMPc (PKA) e recruta lipases sensível a hormônios, dentre outras lipases para os CLs, permitindo o acesso destas enzimas ao seu substrato promovendo a lipólise. (Greenberg et al., 1991; Sztalryd et al., 2003; Tansey et al., 2004). As perilipinas também são marcadores de diferenciação de adipócitos, nos quais a expressão de seu gene é controlada via PPAR $\gamma$  (Bickel, Tansey e Welte, 2009). A ADRP tem funções na incorporação e acumulação de lipídios em diferentes tipos de células (Brasaemle et al., 1997). TIP47 foi originalmente identificada como uma proteína envolvida no tráfego de membrana a partir da rede trans do Golgi. Por

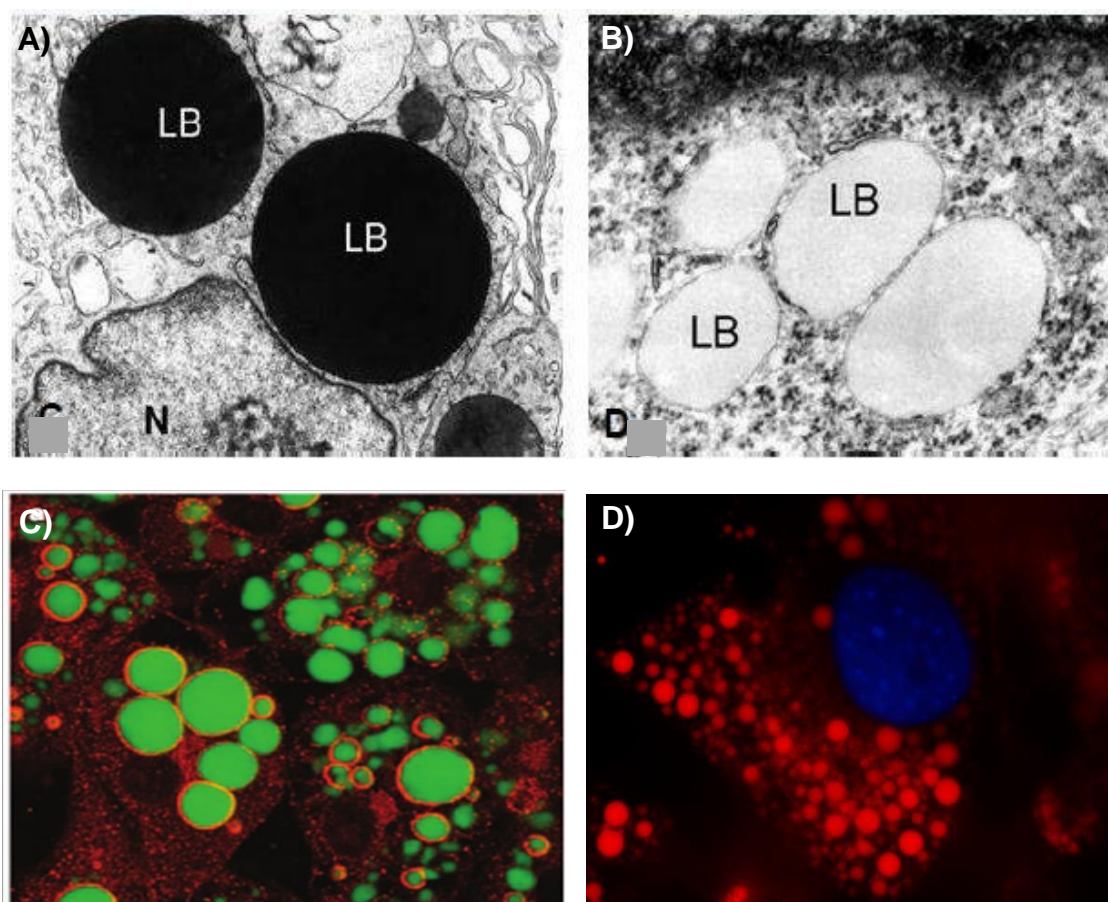
existir em outros compartimentos subcelulares, mas ser rapidamente recrutados após estímulo lipogênicos, TIP47 foi denominada proteína permutável associada aos CLs (Wolins et al., 2001). Outras proteínas também fazem parte do conteúdo protéico dos corpúsculos lipídicos, como as GTPases da família RAB, consideradas reguladoras chave do tráfego vesicular e da interação entre organelas. Rab18 é recrutado para CLs após a estimulação de lipólise por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, e a expressão de Rab18 aumenta o envolvimento da membrana RE em torno de CLs. Rab18 associa-se à superfície de CL e possivelmente à membrana do ER, recrutando os efetores ainda não identificados que facilitam a aproximação das superfícies das membranas. Isso permite a transferência de lipídios entre as camadas de fosfolípidos e associações com elementos do citoesqueleto (Brasaenle et al., 2004).

Com os recentes estudos de proteômica de corpúsculos lipídicos isolados, o número de proteínas identificadas aumentou bastante (Beller et al., 2006; Cermelli et al., 2006; Hodges e Wu, 2010). Muitas delas estão envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios. Os CLs compartimentalizam enzimas como acetil-CoA sintetase, acetil-CoA carboxilase, esqualeno epoxidase, lanosterol sintase, triglicerídeo lípase, álcool desidrogenase, dentre outras (Brasaemle et al., 2004; Fujimoto et al., 2004; Liu et al., 2004; McGookey e Anderson, 1983; Wan et al., 2007). Além disso, proteínas de origem ribossomal, mitocondrial e componentes do RE também foram encontradas estando relacionadas aos corpúsculos lipídicos. Foram identificadas proteínas relacionadas ao transporte vesicular, fusão de membranas e de associação ao citoesqueleto, como proteínas da família das Rabs, fator de ribosilação de ADP (ARF), pequenas GTPases e caveolinas, o que sugere que os corpúsculos lipídicos possam sofrer eventos de fusão e fissão, além de poder interagir com outras organelas (Bartz et al., 2007b; Boström et al., 2007; Fujimoto et al., 2001; Hodges e Wu, 2010; Ozeki et al., 2005; Wu et al., 2000). As GTPases da família RAB são consideradas reguladoras chave do tráfego vesicular e da interação entre organelas (Brasaenle et al., 2004). Proteínas envolvidas na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios, como Ciclooxygenase (COX) e Prostaglandinas (PGE's) foram detectadas em CLs de diferentes tipos celulares sob diferentes condições (Bozza et al., 1997; Chen et al., 2002; Dvorak et al., 1993; Umlauf et al., 2004; Yu et al., 2000, 1998).

Os corpúsculos lipídicos dos leucócitos apresentam domínios intracelulares especializados e induzíveis que funcionam como plataformas de sinalização em

leucócitos ativados para regular o metabolismo e tráfego lipídico, controlar a síntese e a secreção de mediadores inflamatórios; responder a infecções; comandar a inflamação alérgica, sendo por isso alvo para a intervenção terapêutica (Bozza et al., 2007).

Além disso, a biogênese dessas organelas dinâmicas é um evento altamente controlado, dependente de vias sinalização, estímulos específicos e condição patológica.



**Figura 4: Morfologia dos Corpúsculos Lipídicos.** As micrografias eletrônicas mostram a heterogeneidade dos CLs a nível ultraestrutural variando de fortemente de (A) elétron-densos a (B) elétron-lúcidos de acordo com o tipo celular e o estado de ativação. Adaptados de (Melo et al., 2011). (C) Corpúsculos lipídicos em adipócitos. Adipócitos 3T3-L1 foram estimulados para induzir lipólise e depois marcados para Rab18 (vermelho) e lípidos neutros (verde). Rab18 é recrutado especificamente para a superfície de um subconjunto de corpúsculos lipídicos (LDs). A barra de escala representa 10  $\mu$ m (Adaptado de Parton e Martin, 2014). (D) Adipócito marcado com Oil Red O, corante específico para CLs e DAPI, corante específico para núcleo. Aumento de 100x.



### 1.4.2 – BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Existem diferentes modelos propostos para a biogênese de corpúsculos lipídicos, envolvendo transferência de lipídios e proteínas do Retículo Endoplasmático; no entanto, os mecanismos precisos envolvidos continuam a ser estudados. O modelo mais aceito se dá a partir do Retículo Endoplasmático (RE), onde ocorre uma acumulação de lipídios neutros nos folhetos citoplasmático e luminal do RE, seguido de um brotamento do corpúsculo envolto em monocamada fosfolipídica proveniente do folheto citoplasmático (Figura 5) (Bozza et al, 2009; Murphy, 2001; Martin e Parton, 2006b; Robenek et al., 2004). Quando formados, os CLs são suscetíveis a aumentar seu volume, tanto por síntese localizada de lipídios (Kuerschner et al., 2008) como por fusão de CLs (Olofsson et al., 2009). A identificação de proteínas que atravessam a membrana permeando o centro dos CLs, tais como caveolinas e ciclooxigenases (Bozza et al., 1997; Dvorak et al., 1992; Fujimoto et al., 2001; Pol et al., 2001) associado à visualização de estruturas membranosas ou membranotubular dentro dessas organelas, levaram à formulação de uma nova teoria chamada de "o modelo de englobamento, que propõe que o CL em formação incorpora projeções de membrana do RE, de ambos os folhetos, citoplasmática e luminal (Bozza et al., 2009; Wan et al., 2007).

A formação de CLs durante o processo inflamatório é um evento altamente controlado e dependente de vias sinalização e estímulos. Prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) um potente agente quimiotático de leucócitos, induz a biogênese de CLs via receptor acoplado à proteína G em eosinófilos, mas não em macrófagos (Mesquita-Santos et al., 2006). O PAF, através de seu receptor, induz formação de CLs em neutrófilos e eosinófilos (Bozza et al., 2005, Bozza et al., 2009), e as quimiocinas eotaxina (CCL11) e RANTES (CCL5), via receptores CCR3, estimulam formação de CLs em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001, Vieira-de-Abreu et al., 2005). Durante as infecções por *Mycobacterium bovis* BCG e por *T. cruzi*, a formação de corpúsculos lipídicos tem mostrado ser dependente do receptor semelhante a Toll 2 (TLR2), mas não Toll 4 (TLR4) (D'Avila et al., 2011, Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006). Além disso, estudos com *Mycobacterium leprae* em pacientes com lesão nervosa durante a hanseníase demonstraram a capacidade de *M. leprae* para induzir e recrutar corpúsculos lipídicos para fagossomos contendo bactérias. A formação de

corpúsculos lipídicos requer a absorção de bactérias vivas, depende do rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira e do tráfico vesicular. A exclusão de TLR6, mas não o TLR2, aboliu completamente a biogênese de CLs por *M. leprae*, além de inibir a absorção bacteriana em células de Schwann infectadas, indicando um papel crítico para a sinalização dependente de TLR6 nas interações de *M. leprae* e a células hospedeira, o que favorece a fagocitose e subsequente sinalização para indução de biogênese de CLs em células infectadas. A biogênese de CLs induzida por *M. leprae* foi correlada com o aumento da secreção de PGE<sub>2</sub> e IL-10, bem como redução da produção de IL-12 e NO em células de Schwann infectadas por *M. leprae*. A análise de nervos de pacientes com lepra lepromatosa mostrou colocalização de *M. leprae*, CLs e ciclooxigenase-2 nas células, indicando que corpúsculos lipídicos são sítios para síntese de PGE<sub>2</sub> *in vivo*. Estes dados reforçaram o papel das CLs favorecendo a sobrevivência e persistência de micobactérias na célula hospedeira e suportam um papel crítico para os corpúsculos lipídicos na patogênese micobacteriana (Mattos K. A. et al. 2011)

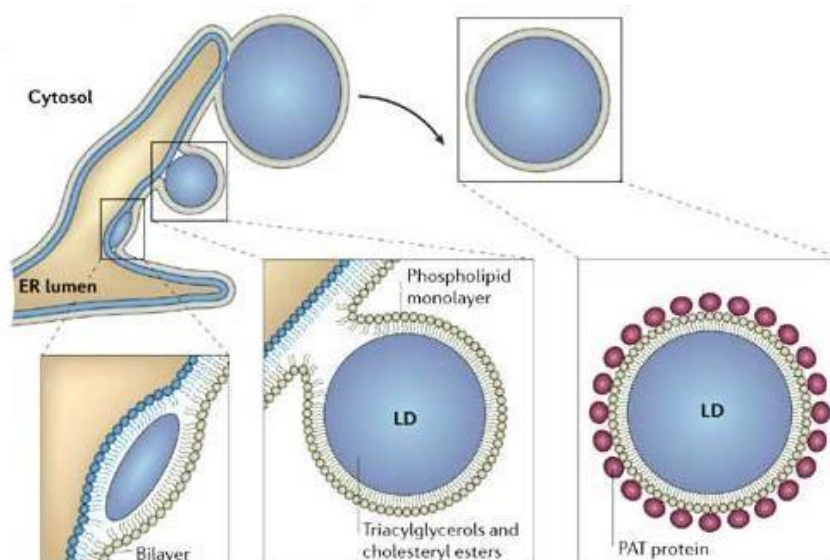
Corpúsculos lipídicos são sítios especializados de produção de enzimas que biossintetizam mediadores lipídicos, como eicosanoides, durante um processo inflamatório. Estudos anteriores demonstraram a síntese de ciclooxigenase (COX), prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), 5- e 15-lipoxigenase (5-LO e 15-LO), leucotrieno C4 (LTC<sub>4</sub>) e fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), todas enzimas precursoras de eicosanoides e compartimentalizadas nos CLs (Wooten et al., 2008; Dvorak et al., 1993; Bozza et al., 2007). Também foram encontrados altos níveis de COX-2 e PGE<sub>2</sub> em macrófagos espumosos, provenientes de lesões desencadeadas durante a patogênese da tuberculose (Rajaram, et al. 2010; Rajaram et al. 2014). Durante as infecções por *T. cruzi*, o aumento no número de CLs em macrófagos inflamatórios se mostrou positivamente correlacionado com a geração de PGE<sub>2</sub>, indicando a importância desta organela na produção de eicosanoides durante a doença de Chagas (Melo et al., 2003).

Além da produção de eicosanoides, os CLs podem desempenhar outros papéis durante as desordens inflamatórias ou em resposta a infecções por compartimentalizar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em leucócitos ativados. A primeira citocina detectada nos CLs foi o TNF- $\alpha$ , a partir de imunomarcção ultraestrutural em biópsias de pacientes com doenças de Crohn (Beil et al., 1995). Posteriormente esta mesma citocina foi detectada em CLs de leucócitos

derivados de pacientes sépticos (Pacheco et al., 2002).

O envolvimento de receptores celulares relacionados ao reconhecimento de patógenos que desencadeiam a biogênese de corpúsculos lipídicos tem sido documentada por nosso grupo, sendo os TLRs os mais amplamente estudados (Pacheco et al., 2002; D'Avila et al., 2006; Cao et al., 2007; Cocchiaro et al., 2008; D'Avila et al., 2008a; Almeida et al., 2014; Almeida et al., 2009). TLR4 foi demonstrado ter relação na biogênese dos corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados por LPS de bactérias Gram-negativas (Pacheco e cols., 2002). Esse receptor atua como uma molécula de reconhecimento primário para LPS de bactérias Gram-negativas. LPS necessita que o receptor TLR4 se heterodimerize com o receptor (MD2), formando um complexo de sinalização, para uma eficiente ativação.

Estudos anteriores demonstram que patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG pode 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 $\gamma$  (Almeida et al. 2009, Almeida et al. 2014). Entretanto, os mecanismos referentes à ativação de PPAR $\gamma$  e metabolismo lipídico perante a ativação de macrófagos por fatores secretados por adipócitos, não estão esclarecidos. Além disso, os dados sugerem que a interação entre macrófagos e adipócitos é um processo complexo e, poucos estudos tem focado desvendar o *cross-talk* entre as células e sua relação com reposta inflamatória e metabolismo lipídico frente a condições patológicas diversas, como por exemplo, infecções por patógenos intracelulares, havendo portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados.



**Figura 5: Modelo de biogênese do Corpúsculo Lipídico: Os lipídios neutros são sintetizados entre os folhetos da membrana do RE.** Os CLs brotam da membrana RE para formar uma organela independente que é delimitada por uma monocamada limitante de fosfolípidos e proteínas associadas. Algumas das proteínas associadas aos CLs mais bem entendidas são membros da família de proteínas PAT (perilipina, ADRP e proteína TIP47) (Martin and Parton, 2006)

## 1.5 – INFECÇÃO MICOBACTERIANA

A modulação do metabolismo lipídico juntamente ao papel fundamental da ativação de PPAR $\gamma$  na formação de corpúsculos lipídicos e resposta imune do hospedeiro, são eventos importantes induzidos por micobactérias para a persistência, sucesso e estabelecimento da infecções micobacterianas.

*Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da Tuberculose (TB), é um patógeno intracelular que sobrevive e replica dentro de células do sistema imune do hospedeiro, primariamente macrófagos. A capacidade de *M. tuberculosis* em se adaptar ao ambiente hostil dentro de macrófagos tem sido fundamental para o seu sucesso como patógeno. Essas micobactérias podem subverter respostas imunes do hospedeiro interferindo em vias de sinalização, vias metabólicas e na expressão de fatores de transcrição, modulando eventos endossomais/fagossomais e criando um nicho protegido para si mesmo (Rajaram et al., 2010).

A transmissão se dá a partir da inalação de pequenas partículas, suspensas no ar, contendo o patógeno que pode permanecer no ambiente por minutos ou horas

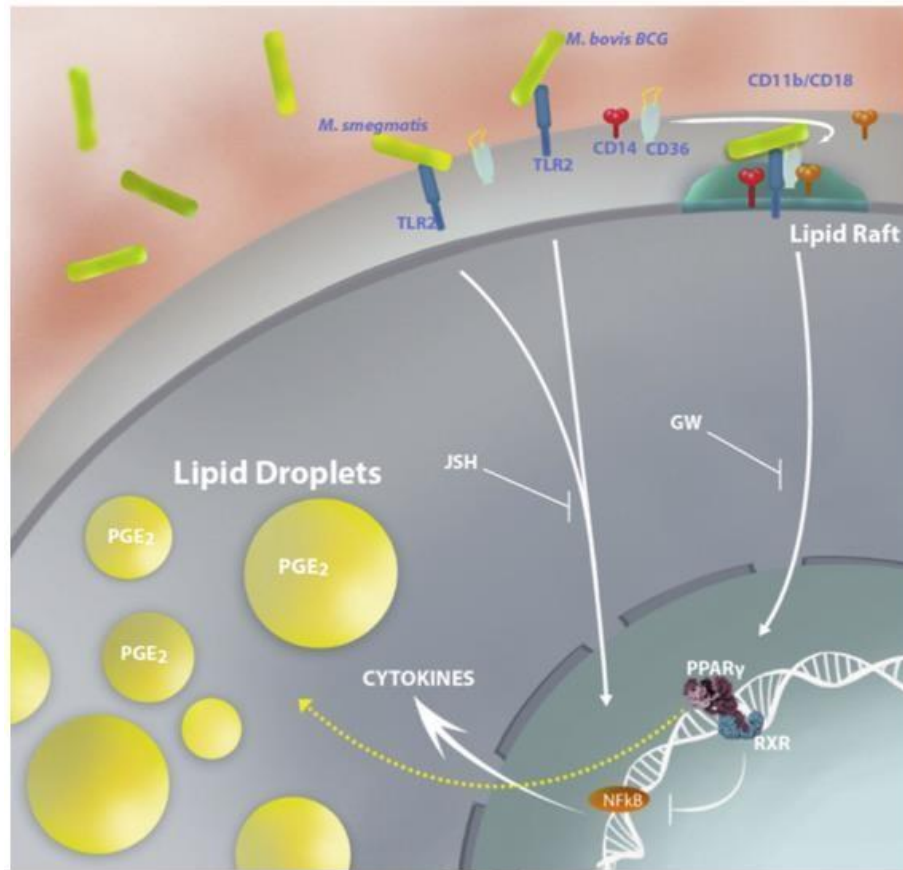
após expectoração de pessoas com tuberculose pulmonar ou laringeal durante tosse, espirro, fala, etc. (Riley et al., 1995). A partir da entrada pelas vias respiratórias, o patógeno atinge os pulmões, onde estabelece o foco primário (Moreno e cols., 1989). Em muitos casos a infecção é assintomática, e a latência clínica pode se estender por toda vida do indivíduo. No pulmão, o microrganismo pode levar a quatro possíveis respostas: 1 - resposta inicial do hospedeiro pode ser efetiva e eliminar os bacilos, impedindo o estabelecimento da tuberculose; 2 – as micobactérias podem ser inativadas, permanecendo dormentes no interior dos fagócitos, não havendo o desenvolvimento da doença; 3 – a micobactéria pode iniciar a multiplicação imediatamente após a infecção ocasionando a tuberculose primária; ou 4 – ocorre reativação da infecção latente, (Flynn and Chan, 2001).

*M. tuberculosis* (Rajaram et al., 2010), *M. bovis* induzem a formação de corpúsculos lipídicos mediante receptor Toll-like 2 (TLR-2) (D'Avila et al., 2006. Almeida et al. 2009, Almeida 2014) e CD36 (Almeida et al., 2014), ativando a via do PPAR $\gamma$  (Almeida et al, 2014). A cooperação CD36-TLR2, associação com CD11b e CD14, e compartimentação de sinalização dentro de "lipid-rafts" desvia o sinal de resposta do hospedeiro com aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$  através de caminhos independentes de NF- $\kappa$ B, levando ao aumento do acúmulo de lipídios em macrófagos e modulação da resposta imune (Almeida et al. 2014) (Figura 6). O aspecto espumoso observado em células enriquecidas em corpúsculos lipídicos também é desencadeado por *M. leprae* como estratégia intracelulares micobacteriana eficaz para adquirir lipídios e modular a resposta imune a fim de favorecer a sobrevivência bacteriana (de Mattos K. A. et al. 2012). No entanto, a ativação de macrófagos *in vitro* com *M. smegmatis*, ou Pam3CSK4, ambos potentes ligantes de TLR2, não conseguiu induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos, sugerindo que TLR2 sozinho não é suficiente e que os co-receptores associados a TLR2 estão envolvidos no reconhecimento bacteriano e podem ser responsáveis pelo recrutamento de sinalização moléculas importantes para expressão de PPAR $\gamma$  e formação de corpo lipídico (Almeida et al. 2014).

Através da modulação da resposta de macrófagos e / ou de aquisição de nutrientes (lipídios), as micobactérias patogênicas proporcionam um mecanismo de escape, levando a um aumento da sobrevivência e replicação nas células do hospedeiro. Macrófagos que acumulam grandes quantidades de corpúsculos lipídicos são chamados de macrófagos espumosos e vários trabalhos têm caracterizado a

presença dos macrófagos espumosos durante infecções micobacterianas (Almeida et al, 2009; Almeida et al. 2014; D'Avila et al, 2008; Melo et al., 2003), aspecto este observado principalmente em granulomas formados durante a tuberculose tanto em condições clínicas quanto experimentais (Cardona et al., 2000). O aspecto espumoso observado em células enriquecidas em corpúsculos lipídicos também é desencadeado por *M. leprae* como estratégia intracelular micobacteriana eficaz para adquirir lipídios e modular a resposta imune a fim de favorecer a sobrevivência bacteriana (de Mattos K. A. et al. 2012).

Considerando o papel do PPAR $\gamma$  em células enriquecidas com corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacteriana, pode-se sugerir que este receptor é regulado e ativado por micobactérias patogênicas como um mecanismo de escape que favorece sua sobrevivência dentro de macrófagos e sua evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Apesar do impacto da obesidade em doenças metabólicas e cardiovasculares ser bem conhecido, seu papel na ativação do sistema imune, expressão de PPAR $\gamma$ , biogênese de corpúsculos lipídicos e funções imunes frente aos estímulos existentes durante as relações entre macrófagos infectados e adipócitos, não é conhecido. Assim, faz-se necessário entender como o estado nutricional do indivíduo pode modular a ativação celular nas interações entre macrófagos e adipócitos frente à infecção por patógenos intracelulares, como *M. bovis*.



**Figura 6: Os heterodímeros TLR2 / CD36 desviam a sinalização intracelular para o aumento da expressão de PPAR $\gamma$  e acumulação de lipídios durante a infecção por *M. bovis* BCG.** Infecção por *Mycobacterium bovis* BCG desencadeia diferentes cascatas de sinalização intracelular dependentes de TLR2 com ativação PPAR $\gamma$  e NF- $\kappa$ B. A cooperação CD36-TLR2 e compartimentação de sinalização dentro de lipid rafts, com a participação dos CD14 e CD11b / CD18, desvia a sinalização de resposta do hospedeiro com aumento da expressão e ativação de PPAR $\gamma$  através de caminhos independentes de NF- $\kappa$ B, levando ao aumento da acumulação de lipídeos nos macrófagos e redução da modulação da resposta dos macrófagos (Adaptado de Almeida et al. 2014).

## 2 – OBJETIVOS

### 2.4 – OBJETIVO GERAL:

Investigar a relação entre fatores secretados por adipócitos (citocinas e adipocinas) na ativação macrofágica durante a infecção pelo patógeno intracelular, *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro*.

### 2.5 – OBJETIVOS ESPECIFICOS:

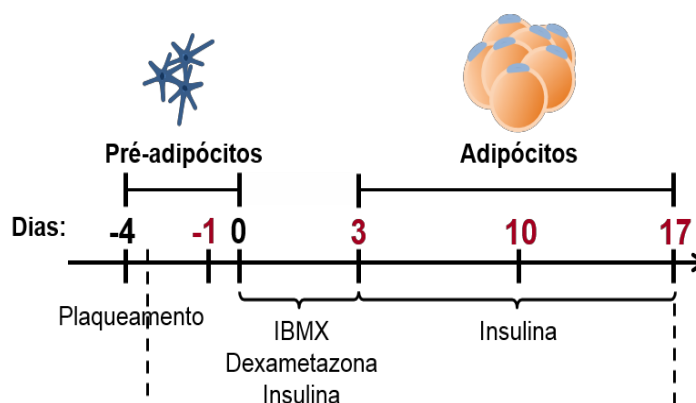
- (I) Avaliar a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com *M. bovis* ou não, e estimulados ou não, com fatores secretados por adipócitos diferenciado;
- (II) Analisar a sínteses de citocinas e adipocinas em macrófagos infectados com *M. bovis* ou não, e estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos diferenciados;
- (III) Analisar a produção de óxido nítrico (nitrito) em macrófagos infectados com *M. bovis* ou não, e estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos diferenciados;
- (IV) Avaliar como fatores secretados por adipócitos diferenciados podem modular a ativação da expressão de PPAR $\gamma$  em macrófagos infectados com *M. bovis in vitro* ou não, e estimulados ou não, com sobrenadante de adipócitos diferenciados



### 3 – MATERIAL 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 em seu estado não diferenciado (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 µg/mL) (*Gibco*) e 10% de soro bovino (*Invitrogen*). As células foram contadas e plaqueadas ( $20 \times 10^3$  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. A diferenciação foi então induzida pela adição de meio DMEM 4,5 g/L de glicose suplementado com penicilina e estreptomicina, 10% soro fetal bovino, 1 µM 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. Introduzimos então 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 (Amaral, L. P. 2017, em preparação).



**Figura 7. 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).

### 3.2 – OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos adultos Wild-Type com idade entre 6 a 8 semanas e aproximadamente 30 g, para obtenção dos macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética/UFJF (protocolo 016/2016 CEUA/UFJF). O lavado peritoneal foi feito 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.). O conteúdo celular foi contado em câmara de Neubauer (tópico 3.3). Em seguida, foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, para contagem de Corpúsculos Lipídicos e dosagem de citocinas no sobrenadante (ELISA) e  $2 \times 10^6$  células por poço em placa de 6 poços para recolhimento de amostras para Western Blot. As células foram plaqueadas com 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 micobacteriana.

### **3.3 – CONTAGEM DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEWBAUER**

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

### **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 que se fosse feito o estímulo dos macrófagos peritoneais. Após as 24 horas completas, o sobrenadante dos adipócitos foi então coletado em tubos falcons e centrifugado em 1500rpm por 10 min, a 25°C. O estímulo foi feito adicionando-se 1mL de sobrenadante nos poços correspondentes contendo  $1 \times 10^6$  macrófagos plaqueados e 2 mL de sobrenadante nos poços contendo  $2 \times 10^6$  de macrófagos, aguardando-se o tempo de 1 hora, para posterior infecção com *Mycobacterium bovis* BCG. 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 – INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG**

Após 1 hora de estímulo dos macrófagos peritoneais com sobrenadante de adipócitos, foi feita a infecção com *Mycobacterium bovis*, BCG. As células foram infectadas, mantendo-se o sobrenadante dos adipócitos ou meio RPMI, com MOI 5:1 ou MOI 1:1 de *Mycobacterium bovis*, BCG da cepa Moreau, obtidas na forma de vacina liofilizada em ampolas de 40 mg contendo aproximadamente  $80 \times 10^6$  bacilos. Os bacilos foram diluídos em RPMI estéril e ajustados na concentração de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Na hora do uso os bacilos foram vortexados, sonicados por 5 minutos e homogeneizados 10 vezes por passagem em

agulha de insulina. Após 1 hora, 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 6, 24 e 48 horas para coleta das amostras do sobrenadante para dosagem de citocinas, adipocinas e NO. Foi realizada a fixação das células nas lâminulas para posterior coloração com Oil Red O e DAPI para contagem de corpúsculos lipídicos. As células cultivadas em placas de 6 poços, foram lisadas para obtenção de proteínas totais para realização do Western Blot.

### **3.6 – 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 Oil Red O (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,3% (0,3 g de Oil Red 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 corpúsculos lipídicos, 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 Oil red O, e incubando por 5 minutos, no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequencia 2 vezes com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células.

Os corpúsculos lipídicos 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).

### 3.7 – AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram capturadas a partir das lâminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa quanto à 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.

### 3.8 – WESTERN BLOT

O lisado celular foi obtido com 70  $\mu$ L de tampão de amostra (Trizma base 3g, água Milli Q 40 mL, glicerol 40 mL, SDS 8g,  $\beta$ -Mercapto Etanol 20 mL, Azul de Bromofenil 250  $\mu$ L), 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  $\mu$ L de amostra em gradiente de acrilamida 10%, 125 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos) e transferida 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 H<sub>2</sub>O 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 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Posteriormente, 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. Como controle positivo experimental, usamos um anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (BD Transduction Laboratories) na concentração de 1:5.000. 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 “Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (Amersham Hyperfilm ECL – High performance chemiluminescence film) GE Healthcare Limited.

### 3.9– DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  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.

### 3.10 – 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 ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), pela ação da enzima nitrato-redutase e o nitrito quantificado pela reação de Griess. Para a reação de Griess adicionou-se a 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (Sulfonilamida em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  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  $\mu\text{M}$  de NO.

### 3.11 – 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).

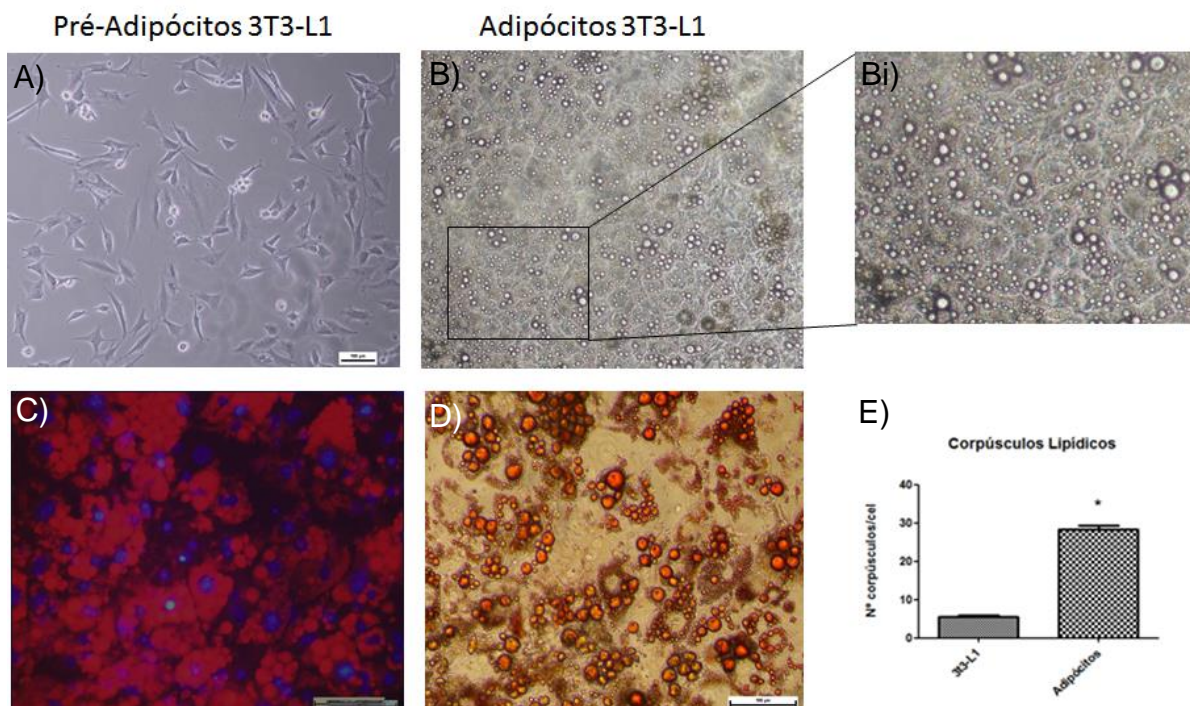
## 4 – RESULTADOS

### 4.1. DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS NIH3T3-L1

Primeiramente, confirmamos a diferenciação de pré-adipócitos da linhagem NIH3T3- L1. Foram avaliadas as diferenças na morfologia celular, no acúmulo e na hipertrofia de corpúsculos lipídicos, no dia 0 e no dia 17 de diferenciação adipogênica. Durante o período que antecede os estágios de diferenciação celular, as células encontravam-se com características morfológicas típicas de fibroblastos, apresentando-se alongadas, com citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme além de longos prolongamentos (Figura 8A). A partir do 4º dia em que as células NIH3T3-L1 foram submetidas ao processo de diferenciação, mudanças na morfologia celular começaram a ocorrer, e no 17º dia de diferenciação, as células apresentaram características típicas de adipócitos, como forma arredondada, núcleo deslocado para a periferia e intenso acúmulo de corpúsculos lipídicos por todo citoplasma (Figura 8B e 8Bi).

A biogênese de corpúsculos lipídicos foi utilizada como indicativo de diferenciação adipogênica das células NIH3T3-L1. A partir do 4º dia em que as células foram submetidas ao processo de indução de diferenciação, foi verificado um aumento em número e tamanho de corpúsculos lipídicos (Figura 8C). No 17º dia, onde observamos a morfologia de adipócitos completamente diferenciados, esse aumento foi considerável ao se comparar com as NIH3T3-L1 (Figura 8E e F). As análises foram feitas com a coloração de *Oil Red O* (ORO), corante específico para lipídios neutros, e DAPI para o núcleo, sendo observadas por microscopia de fluorescência. Observou-se que quanto maior o tempo de diferenciação das células e mais precisamente no 17º dia, maior o acúmulo de corpúsculos lipídicos, indicando que as células estavam em estágio completo de diferenciação. Aumento este que se mostrou significativo

Celulas pré-adipogênicas em seu estado indiferenciado, possuem baixa quantidade de corpúsculos lipídicos quando comparadas aos adipócitos diferenciados, o que foi evidenciado pela marcação com Oro Red O (Figura 8E).



**Figura 8: Análise do processo de diferenciação celular.** (A) Morfologia de NIH3T3-L1 indiferenciadas, aumento de 20x e (B) Morfologia de adipócitos diferenciados, no 17º dia de diferenciação adipogênica, aumento de 10x e (Bi) ampliação do campo. As imagens foram obtidas a partir de microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100 no aumento de 20x. (C) Análise por microscopia de fluorescência de adipócitos diferenciados; (D) Análise por microscopia de luz de adipócitos diferenciados. As células foram coradas com ORO e em seguida marcadas com corante DAPI para observação dos núcleos. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência invertido, em aumento de 20x. (E) Quantificação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3-L1 e adipócitos. (\*) Indica diferença significativa entre os grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .



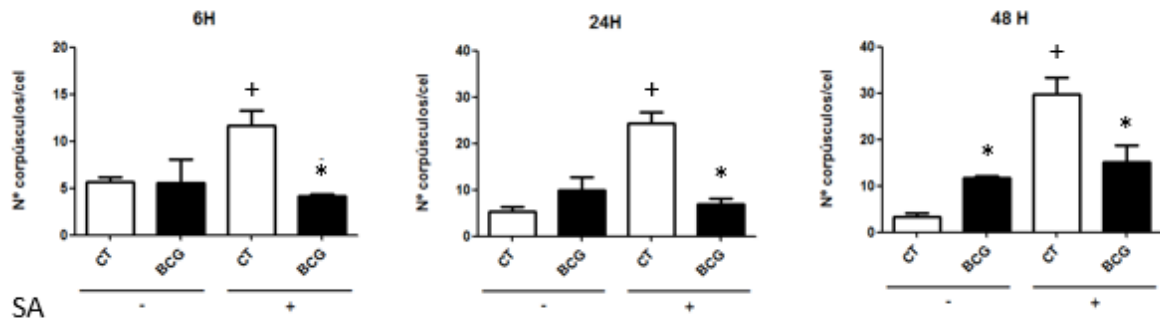
#### **4.2 - BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG**

Nós avaliamos a biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos peritoneais infectados ou não com *Mycobacterium bovis* BCG com (MOI 1:1) (Figura 9) ou (MOI 5:1) (Figura 10) e estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos diferenciados. Os gráficos indicam respectivamente tempos de 6, 24 e 48 horas após a infecção micobacteriana.

Em MOI 1: 1, nossos resultados indicaram que a infecção micobacteriana foi capaz de induzir a formação de CL de modo significativo após 24 e 48 h, mas não em 6 horas. De modo interessante, podemos observar que o sobrenadante dos adipócitos foi capaz de induzir a formação de CL em macrófagos não infectados evento que foi inibido na presença do BCG nos três tempos analisados (Figura 9).

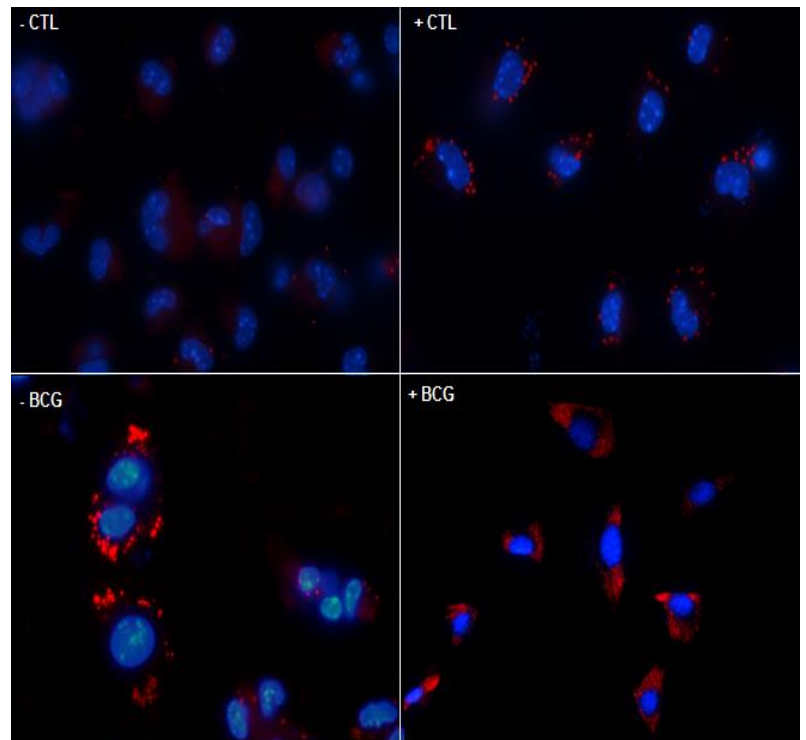
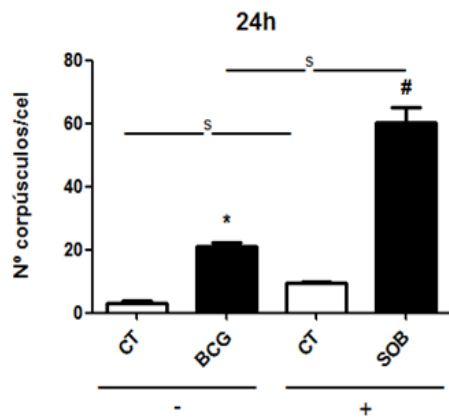
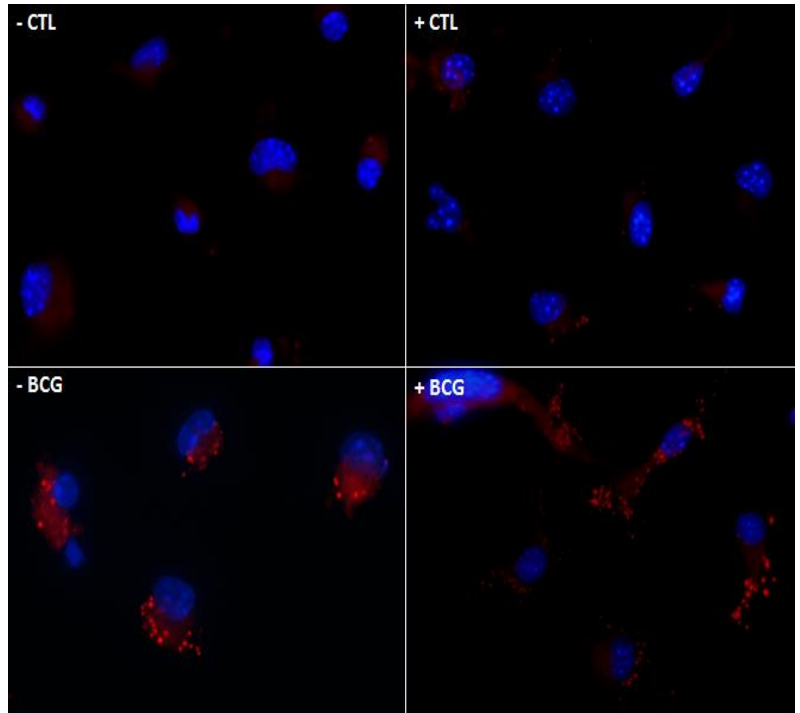
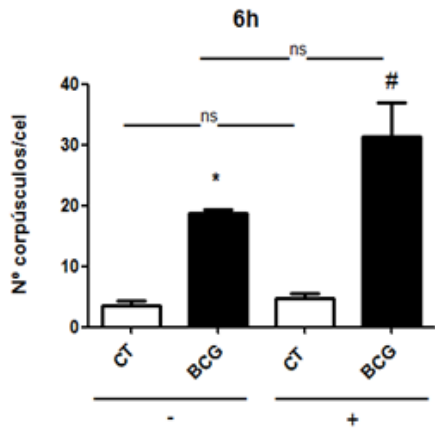
Em MOI 5:1 podemos observar que nos três tempos avaliados BCG foi capaz de induzir a formação de CL, evento que pareceu ser potencializado na presença de sobrenadante de adipócitos (Figura 10). Comparando-se apenas os grupos controles, podemos notar que o estímulo com sobrenadante proporcionou uma maior biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais, sendo estatisticamente significativa para 24 e 48 h.

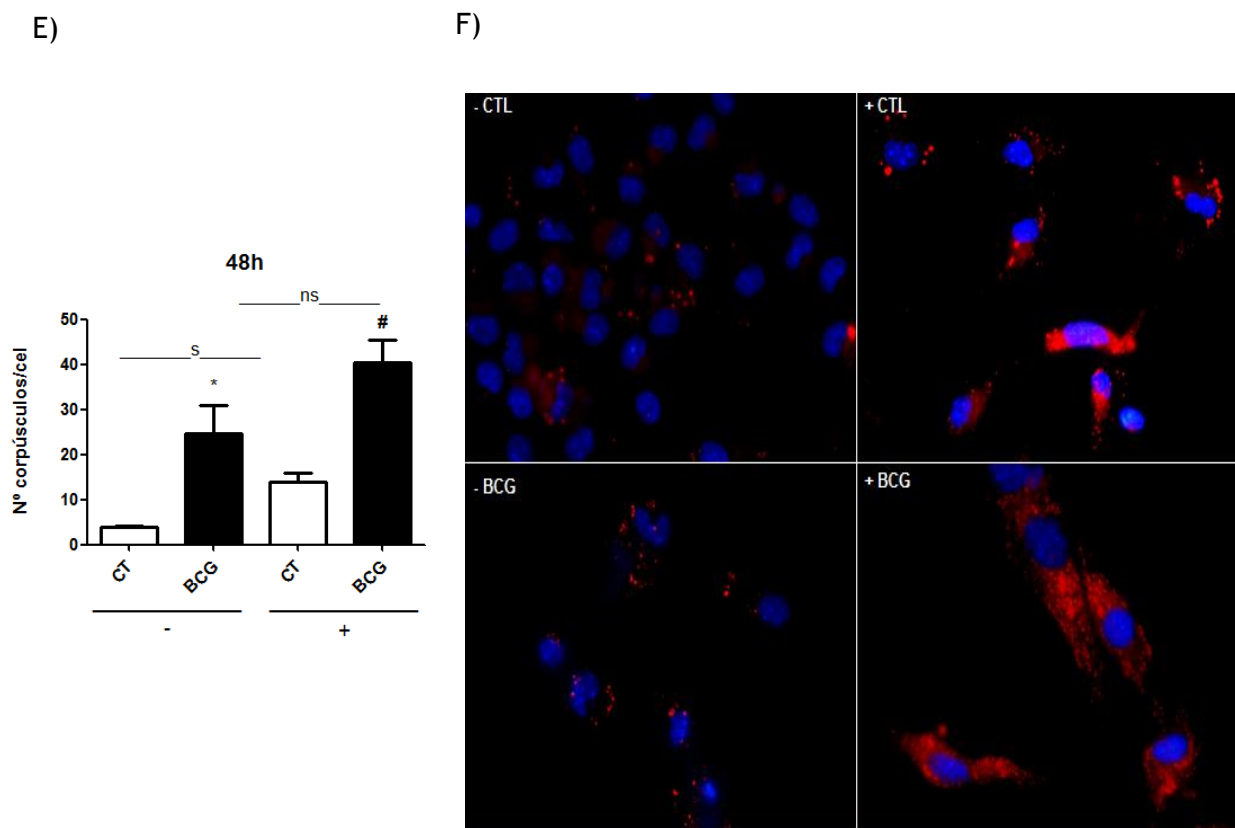
## MOI 1:1



**Figura 9: Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 1:1, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-).** O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (A) 6 hs após a infecção; (B) 24 hs após a Infecção e (C) 48 hs após infecção. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. (s) indica diferença significativa entre o grupo controle meio de cultura (ausência de sobrenadante) e controle estimulado. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

MOI 5:1





**Figura 10: Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em macrófagos infectados ou não por *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não com sobrenadante de adipócitos (-).** O estímulo com sobrenadante é indicado com sinal +. (A e B) 6 hs após a Infecção; (C e D) 24 hs após a infecção e (E e F) 48 hs após infecção. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle; (#) indica diferença significativa entre grupo BCG meio de cultura (ausência de sobrenadante) e BCG estimulado com sobrenadante; (s) indica diferença significativa entre o grupo controle meio de cultura (ausência de sobrenadante) e controle estimulado. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 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 Corpúsculos Lipídicos foi feita após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI, aumento de 100X.

#### **4.3 – PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG**

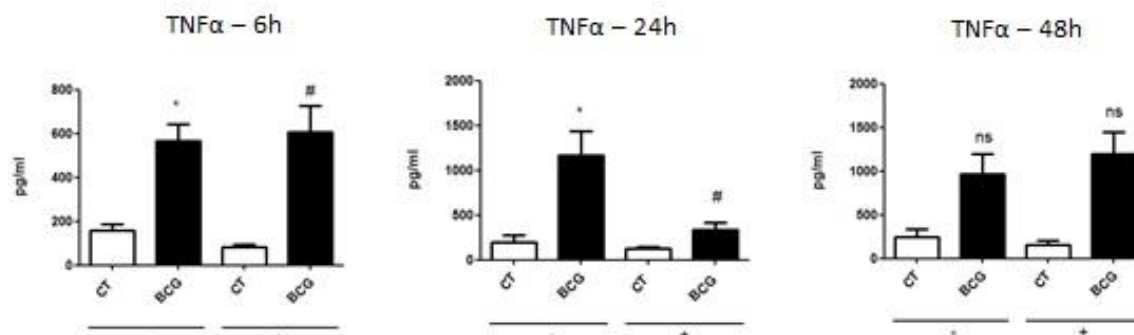
Nós avaliamos a produção das citocinas TNF $\alpha$  (Figura 11) e IL-10 (Figura 12), através de ensaio de ELISA, nos tempos de 6, 24 e 48 horas de infecção por *M. bovis* BCG, com MOI 1:1 ou MOI 5:1 e/ou estímulo com sobrenadante de adipócitos.

Nos macrófagos os níveis de TNF- $\alpha$  no tempo de 24 horas, foram aumentados, na presença de sobrenadante de adipócitos, e durante a infecção (MOI 1:1) este efeito pareceu ser potencializado o que não foi observado para os tempos de 6 e 48 h (Figura 11 A). Os macrófagos infectados com MOI 5:1 produziram quantidades significativas de TNF- $\alpha$  nos tempos de 6h e 48h, e esta produção não foi alterada após o estímulo com sobrenadante dos adipócitos. De maneira interessante para MOI 5:1 os macrófagos

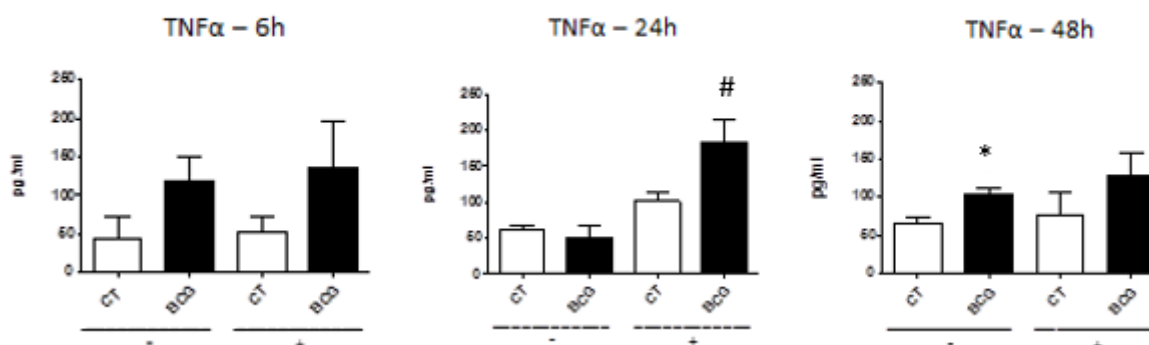
infectados por BCG na presença do sobrenadante tiveram seus níveis de TNF- $\alpha$  significativamente diminuídos no tempo de 24 h, efeito este que não foi observado para os tempos de 6 e 48h (Figura 11B).

Os níveis de IL-10 encontrados nos três tempos de infecção, para MOI 1:1 apresentaram um leve aumento quando comparados aos macrófagos controles. Nos macrófagos estimulados com sobrenadante e infectados com BCG houve uma diferença significativa quando comparados aos macrófagos apenas estimulados após 6 e 24h, para 48 h apesar de não ser significativo, observamos o mesmo perfil de indução (Figura 12A). Em MOI 5:1 apesar do BCG apresentar um perfil de indução de IL-10 os valores não foram significativos quando comparamos com seus respectivos controles (Figura 12B).

### A) MOI 5:1

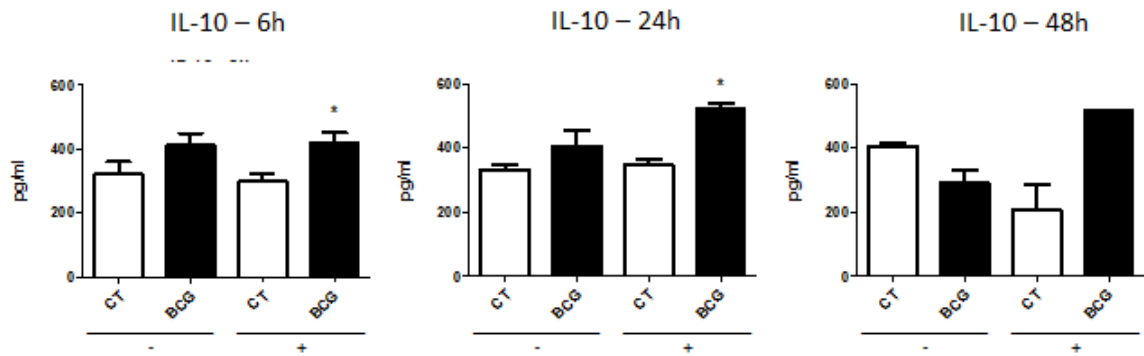


### MOI 1:1

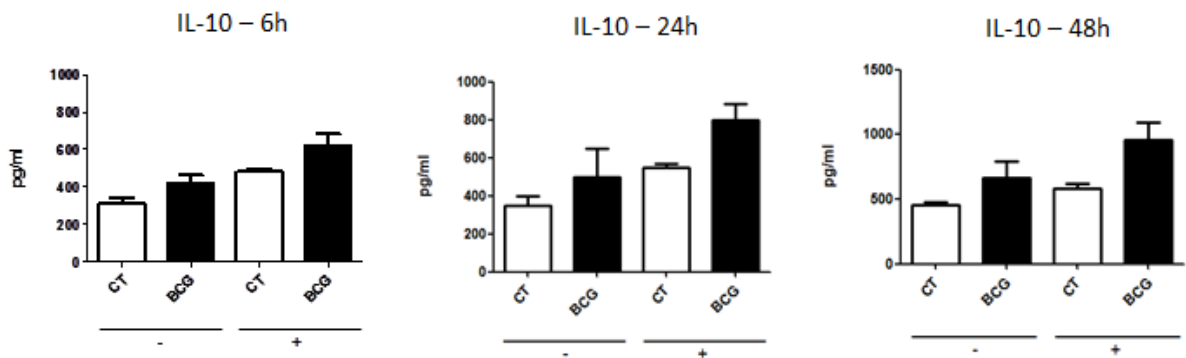


**Figura 11: Síntese de TNF- $\alpha$ :** Síntese de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, (A) MOI 1:1 (B) MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. (#) indica diferença significativa entre grupo BCG meio de cultura (ausência de sobrenadante) e BCG estimulado com sobrenadante; (s) indica diferença significativa entre o grupo controle meio de cultura (ausência de sobrenadante) e controle estimulado. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,0$ .

### A) MOI 1:1



### B) MOI 5:1



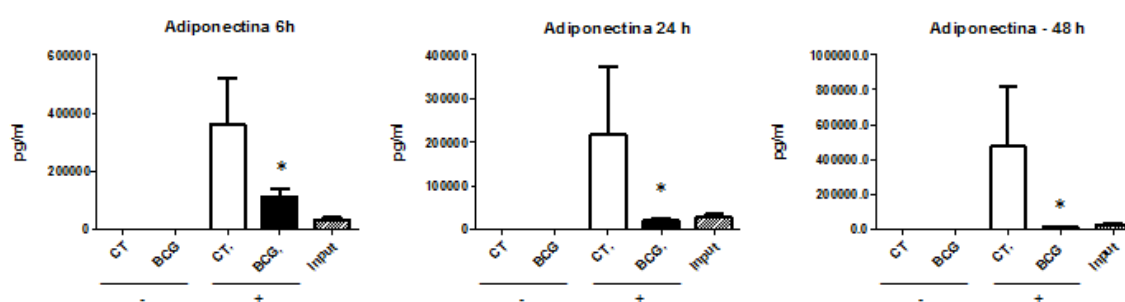
**Figura 12: Síntese de IL-10:** Síntese de IL-10 em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, (A) MOI 1:1 e (B) MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos consecutivos, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4 – PRODUÇÃO DE ADIPOCINAS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG

Nós avaliamos os níveis de leptina e adiponectina em cultura de macrófagos estimulados com sobrenadante de adipócitos, ou não, e infectados com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), ou não, através de ensaio de ELISA, nos tempos de 6, 24 e 48 horas.

Não foram encontrados níveis significativos da produção de leptina pelos macrófagos, nem com relação aos grupos estimulados com sobrenadante, nem nos grupos não estimulados (dados não mostrados). Além disso, foram encontrados baixos níveis de leptina no sobrenadante de adipócitos diferenciados, sendo este coletado no 17<sup>o</sup> dia de diferenciação (dados não mostrados).

Quanto aos níveis de adiponectina, os grupos não estimulados produziram níveis não quantificados quando comparados aos grupos estimulados com sobrenadante, onde a produção desta adipocina foi extremamente elevada (Figura 13). Podemos observar ainda, que a presença de *M. bovis* BCG induziu uma diminuição significativa na produção de adiponectina em 6 horas de infecção e estímulo com sobrenadante, o que foi intensificado após 24 horas e mantido após 48 horas, nas mesmas condições.



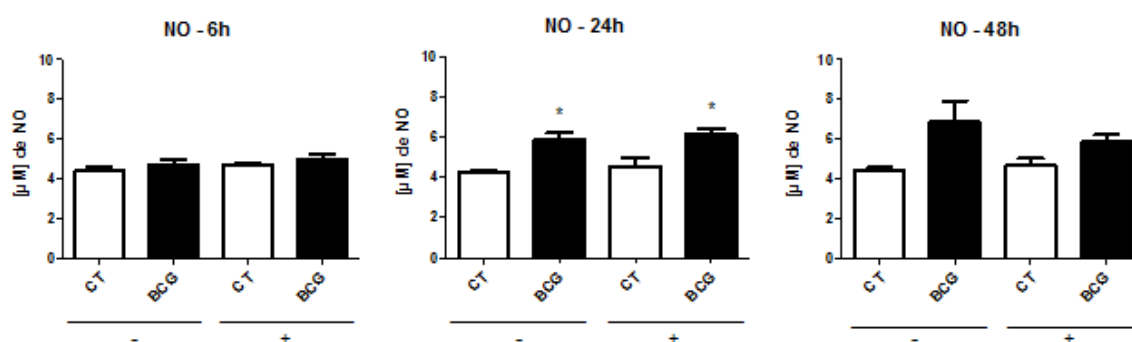
**Figura 13: Síntese de Adiponectina:** Síntese de Adiponectina em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$



#### 4.5 – PRODUÇÃO DE NITRITO EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG..

A produção de Óxido Nitrico (NO) por macrófagos peritoneais foi avaliada por detecção de nitrito nos grupos estimulados com sobrenadante de adipócitos, ou não, e infectados com *M. bovis* BCG, ou não (Figura 14).

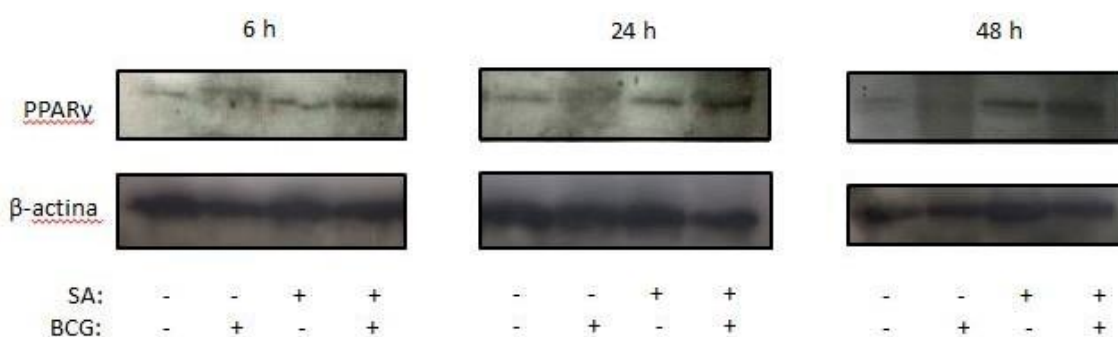
No tempo de 6 horas, os níveis de nitrito permaneceu praticamente inalterado entre os grupos, não sendo observada nenhuma diferença significativa entre os mesmos. No entanto, após 24 horas de infecção micobacteriana verificamos uma indução na produção de nitrito que não foi alterada pelo estímulo com sobrenadante de adipócitos. No tempo de 48 horas, este resultado apresentou o mesmo perfil, apesar de não ser significativo, (Figura 14).



**Figura 14: Produção de Nitrito:** Produção de NO em macrófagos peritoneais em grupos controles ou infectados com *M. bovis* BCG, MOI 5:1, estimulados (+) ou não (-) com sobrenadante de adipócitos. (\*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão, sendo as diferenças significativas para  $p \leq 0,05$

#### 4.6 – EXPRESSÃO DE PPAR $\gamma$ EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS OU NÃO COM SOBRENADANTE DE ADIPÓCITOS E INFECTADOS OU NÃO COM *Mycobacterium bovis* BCG

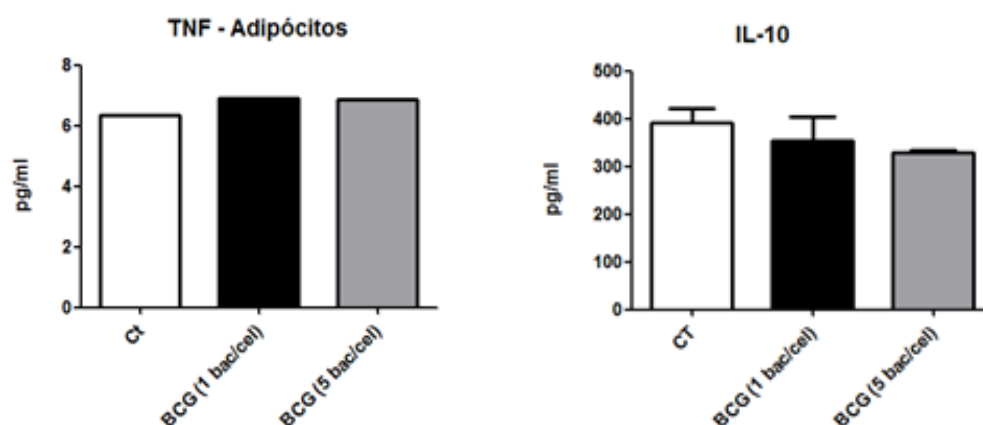
A expressão do receptor nuclear PPAR $\gamma$  foi analisada a partir da técnica de Western Blot, durante os tempos de 6, 24 e 48 hs de infecção micobacteriana, ou não, e estímulo com sobrenadante de adipócitos, ou não (Figura 15). O resultado indica que a expressão gênica de PPAR $\gamma$  é aumentada na presença de infecção nos três tempos analisados e o estímulo com sobrenadante de adipócitos potencializou essa expressão em todos os tempos. De modo interessante o estímulo com sobrenadante nos macrófagos controles também mostrou um perfil aumentado de indução da expressão quando comparados aos macrófagos controles que não foram estimulados com sobrenadante..



**Figura 15: Expressão de PPAR $\gamma$ :** Macrófagos foram estimulados com sobrenadante de adipócitos (SA +) ou não (SA -) e infectados com *M. bovis* BCG MOI 5:1 (BCG +) ou não (BCG -), durante 6, 24 e 48 horas.

#### 4.7 – PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- $\alpha$ E IL-10 EM ADIPÓCITOS INFECTADOS

Nós avaliamos o efeito da infecção com *M. bovis* BCG (MOI1:1) e (MOI 5:1) em adipócitos na produção de citocinas inflamatórias. As células foram mantidas em meio RPMI 2% de soro por mais 24 horas após o 17<sup>o</sup> dia de diferenciação. Os resultados indicam que a infecção micobacteriana não alterou os níveis de TNF comparando-se os grupos controle. Porém, a dosagem de IL-10 indicou a produção dessa citocina pelos adipócitos, onde se observou um decréscimo não significativo dessa citocina comparando-se os grupos controle e infectados com 1 bacilo/célula ou 5 bacilos/célula (Figura 16).



**Figura 16: Produção de citocinas por adipócitos infectados.** A) Produção de TNF $\alpha$ . B) Produção de IL-10. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão.

## 4 – DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a extensão da expectativa de vida e o consumo em excesso de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares expuseram a população em geral a problemas de saúde emergentes. A chamada síndrome metabólica (SM) é composta por um conjunto de fatores como obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão, e vem aumentando nos países industrializados e em desenvolvimento, levando ao aparecimento precoce de doenças relacionadas (Oglesby et al. 2006). Todo conjunto de fatores de SM contribui para o desenvolvimento de um estado inflamatório chamado metainflamação, o qual está associada à ativação da resposta imune inata (Mastrocola et al. 2017).

Além de fatores genéticos, vários fatores ambientais também estão relacionados ao aumento da massa de tecido adiposo. Este tecido é responsável pela secreção de hormônios e diversas moléculas regulatórias, muitas delas pró-inflamatórias responsáveis pela ativação do sistema imunológico e sendo assim relacionadas a um estado inflamatório juntamente a um estresse oxidativo (Kang et al. 2017; Prado et al. 2009; Keane et al. 2017; Lafontan et al. 2005). Os macrófagos são um exemplo de células de defesa infiltradas no tecido adiposo em resposta à fatores inflamatórios produzidos por adipócitos que se intensificam com a obesidade, como o TNF- $\alpha$  e MCP-1. Diversas outras adipocinas são secretadas pelo tecido adiposo, destacando-se a leptina, a adiponectina, a adipsina, a resistina, o PAI-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, o IGF-1, a visfatina, entre outros, que também aumentam na obesidade, com exceção da adiponectina, (Lauterbach et al. 2017). Esses fatores produzidos tanto por macrófagos quanto pelo tecido adiposo caem na corrente sanguínea, tornando a inflamação sistêmica (Hotamisligil 2006; Hellmann et al. 2013; Ray et al. 2016; Guilherme et al. 2008).

Devido ao impacto da obesidade como doença inflamatória e sua relação com o sistema imune ser pouco compreendido, nosso trabalho busca elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na interação entre macrófagos e adipócitos e desvendar os processos da resposta inflamatória e metabolismo lipídico durante a patogênese micobacteriana *in vitro*.

Primeiramente, buscamos o estabelecimento do protocolo de diferenciação celular

adipogênica, utilizando para isso a linhagem de pré-adipócitos NIH3T3-L1. Este é o modelo de estudo do processo de adipogênese mais bem caracterizado e vários trabalhos tem sido realizados com base nesse modelo (Ntambi et al. 2000; Guilin et al. 2017; Wu et al. 2017, Maya-Monteiro et al. 2008; Fazolini et al. 2015 Jeffery et al. 2015). Nossos resultados confirmaram o estabelecimento do processo de diferenciação celular a partir da análise de células indiferenciadas e adipócitos completamente diferenciados (Figura 8) (Dissertação de mestrado, Amaral, L. P.). Comparações da morfologia celular foram feitas assim como a biogênese de corpúsculos lipídicos. As células passaram de morfologia alongada, citoplasma abundante, núcleo grande e fusiforme e longos prolongamentos para células com forma arredondada, núcleo deslocado para a periferia e intenso acúmulo corpúsculos lipídicos por todo citoplasma. A adipogênese é caracterizada pela biogênese e hipertrofia dos corpúsculos lipídicos, indicando o amadurecimento de adipócitos em formação, além da proliferação e migração de células precursoras de adipócitos (Jeffery et al. 2015; Spalding et al. 2008).

Vários trabalhos recentes têm demonstrado que os corpúsculos lipídicos estão relacionados a um processo inflamatório onde a partir de estímulos inflamatórios e infecciosos, um aumento em número e tamanho é observado, ver revisão (Bozza e Bandeira-Melo, 2005, Bozza et al., 2009). Macrófagos que acumulam grandes quantidades de corpúsculos lipídicos (chamados macrófagos espumosos) têm sido caracterizados durante infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (Cardona et al., 200; Peyron et al., 2008), *M.bovis* BCG (D'Avila et al, 2008; Almeida et al, 2009; Almeida et al. 2014;) e por *Mycobacterium leprae* (de Mattos K. A. et al. 2012), como estratégia intracelulares eficaz para adquirir lipídios e modular a resposta imune a fim de favorecer a sobrevivência micobacteriana.

Assim, neste estudo, nós analisamos a produção de corpúsculos lipídicos por macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG, MOI 1:1 e MOI 5:1, em três tempos diferentes de estímulo e infecção, 6, 24 e 48 horas. Na infecção com MOI 5:1, nos três tempos, a micobactéria induziu o aumento de corpúsculos lipídicos, sendo que nos grupos estimulados com sobrenadante, este aumento foi potencializado e significativo, quando comparados aos macrófagos infectados que não receberam sobrenadante (Figura 10).

Curiosamente, a infecção com MOI 1:1, não foi capaz de induzir o mesmo perfil de biogênese de corpúsculos lipídicos (Figura 9), quando comparados aos níveis induzidos por MOI5:1. Mas de modo interessante, nos macrófagos estimulados com sobrenadante, na presença de infecção com MOI 1:1 observamos uma modulação negativa na biogênese de corpúsculos lipídicos quando comparados aos controles apenas estimulados com sobrenadante.

Estudos anteriores de nosso grupo demonstram que patógenos intracelulares como o *M. bovis* BCG, pode 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 $\gamma$  (Almeida 2009, Almeida et al. 2014). A expressão de PPAR $\gamma$  também foi analisada nos tempos de 6, 24 e 48 horas de infecção (Figura 15), e os resultados demonstraram que a expressão deste receptor ocorreu em maiores níveis nos grupos infectados, sendo potencializada diante de estímulo com sobrenadante. Isso indica um possível efeito de fatores secretados presentes no sobrenadante de adipócitos na indução da formação de corpúsculos lipídicos e expressão de PPAR $\gamma$ .

Alguns estudos demonstraram também que macrófagos possuem mecanismos para absorver lipídios no tecido adiposo, sendo este outro fator que poderia estar contribuindo para o aumento de corpúsculos lipídicos por macrófagos em contato com sobrenadante de adipócitos (Lindsey et al. 2014 e Cinti et al. 2005). Além de aderirem a adipócitos ou gotículas lipídicas, já foi observado que os macrófagos formam contatos uns com os outros quando envolvem os adipócitos muito maiores, sendo observadas células gigantes multinucleares encontradas em distúrbios granulomatosos (Okamoto et al. 2003). Em estudos anteriores demonstraram que a co-cultura de adipócitos diferenciados a partir da linhagem NIH3T3-L1 e macrófagos da linhagem RAW264 resulta na regulação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e MCP-1 (Suganami et al. 2017). Tais alterações inflamatórias são induzidas em co-cultura sem contato entre as células, sugerindo o papel de fatores solúveis (Suganami et al. 2017). Macrófagos co-cultivados com adipócitos e estimulados com LPS, produziram níveis mais elevados de IL-6, bem como de MCP-1 (Yamashita et al. 2008). Além disso, a expressão de genes associados com a resistência à insulina e risco cardiovascular (como os codificadores de IL-6, MCP-1, RANTES e CXCL1/KC) estava aumentada em

adipócitos quando co-cultivados com macrófagos na presença de LPS (Yamashita et al. 2008). Esses dados suportam a hipótese de que o tecido adiposo pode desempenhar um papel importante na amplificação da inflamação e a interação adipócitos-macrófagos desempenha um papel fundamental.

Nós avaliamos a secreção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-10 por macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos e infectados ou não com *M. bovis* BCG com MOI 1:1 ou MOI 5:1. Para MOI 5:1, nossos resultados indicaram que a produção de TNF- $\alpha$  foi maior nos grupos infectados, quando comparado aos grupos controles correspondentes (Figura 11 B). Tal aumento, foi potencializado pela presença de sobrenadante, nos tempos de 6 e 48 horas de infecção. Curiosamente, o tempo de 24 horas, onde é observado o pico de formação de corpúsculos lipídicos, a produção de TNF- $\alpha$  decaiu significativamente no grupo infectado estimulado, quando comparado ao grupo infectado não estimulado (Figura 11 B).

O TNF- $\alpha$ , é secretado principalmente por macrófagos e possui diversas ações pró- inflamatórias. Além de causar a morte de células tumorais, TNF- $\alpha$  pode promover a resposta imune e inflamatória estimulando outras citocinas que combatem infecções, e recrutando neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. (Shen et al. 2017; Xu et al. 2017; Nourian et al. 2017). TNF- $\alpha$  também está envolvido na associação da hipertensão e dislipidemia com a obesidade e resistência à insulina. Pode estimular a lipólise e inibir a lipase lipoprotéica, aumentando os ácidos graxos livres no plasma e causando resistência a insulina. No tecido adiposo ele inibe a produção de adiponectina e estimula a produção de IL-6, o que também contribui para esta resistência. Estudos demonstram que pacientes obesos apresentam níveis de TNF- $\alpha$  maiores quando comparados ao grupo controle, o que sugere que a obesidade está associada com um aumento dos níveis plasmáticos dessa citocina. (Saxena et al. 2013). Outra das suas funções é a inibição da expressão de PPAR $\gamma$  em vários estágios, incluindo a transcrição, estabilidade do RNAm e síntese protéica nos adipócitos (Guilherme et al. 2008; Tang et al. 2006) durante a obesidade. Considerando o papel de PPAR $\gamma$  na indução do acúmulo lipídico (Lefterova et al. 2014; Christodoulides and Vidal-Puig 2010; Arimura et al. 2004), sua inibição acaba levando ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, causando grande impacto na sensibilidade à insulina e processos inflamatórios. Essa inibição não foi observada

em nossos resultados de 6, 24 e 48 horas, na presença de infecção, onde há produção de TNF- $\alpha$  e expressão de PPAR $\gamma$  (Figura 11B e 15). Além disso, apesar da dosagem de TNF- $\alpha$  ser maior nos grupos que receberam estímulo com sobrenadante de adipócitos (Figura 11), nossos resultados demonstraram que a produção dessa citocina está provavelmente mais associada à sua produção por macrófagos e não por adipócitos (Figura 16)

Além disso, a baixa produção de TNF- $\alpha$  pelos adipócitos infectados (Figura 16 A) demonstra que essa citocina é produzida pelos macrófagos e não por adipócitos, onde a produção de TNF- $\alpha$  reduzida é característica, o que corrobora com estudos anteriores (Weisberg et al. 2003; Takuya et al. 2008; Okamoto et al. 2003).

Os níveis basais de corpúsculos lipídicos encontrados nos macrófagos infectados com MOI 1:1 e estimulados com sobrenadante, acompanha altos níveis de TNF- $\alpha$  às 6, 24 e 48 h de infecção, o que não é observado em MOI 5:1. Isto indica possíveis efeitos imunorregulatórios da concentração micobacteriana por célula infectada, no que diz respeito aos níveis de citocina TNF- $\alpha$ , biogênese de corpúsculos lipídicos e tempo de infecção. Estudos recentes vêm contestando a ideia de que a interação entre adipócitos e macrófagos fornece um perfil pró-inflamatório de macrófagos no tecido adiposo obeso. Os resultados apontam efeitos moduladores dos adipócitos sobre o fenótipo de macrófagos em seres humanos indicando possíveis vias moleculares envolvidas. Meios condicionados de adipócitos (ACM) reduzem fortemente a secreção de IL-12p40 por macrófagos estimulados com LPS, enquanto que a produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas permaneceram praticamente inalteradas. Lipídios identificados em ACM – PGE<sub>2</sub>, ácido linoleico e ácido oleico, foram potentes inibidores da secreção de IL-12p40 (Inge et al. 2017).

Neste estudo, nós avaliamos os níveis de IL-10, uma citocina de resposta anti-inflamatórias característica, que possui efeitos imunoregulatórios sobre macrófagos e sobre a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. É capaz também de inibir a proliferação de células Th1 e favorecer o desenvolvimento de respostas Th2 (Xue et al. 2017; Kubota et al. 2017; Alvarado et al. 2017). Nossos resultados não demonstraram diferenças importantes de produção de IL-10 entre os tempos de estímulo. Apesar de um aumento significativo ser notado entre os grupos controles e infectados com MOI 1:1, que receberam sobrenadante de adipócitos às 6 e 24 hs. Em MOI 5:1 apesar de não significativo houve um perfil de indução da produção de IL-10



nos macrófagos estimulados e infectados quando comparados aos seus controles, em todos os tempos analisados (Figura 12 A e B).

A produção de adipocinas pelo tecido adiposo desempenha função-chave nas complicações cardiometabólicas induzidas pela obesidade. A leptina desempenha função importante na manutenção da homeostase metabólica, incluindo a sensibilidade à insulina, regulação dos depósitos energéticos, diminuindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético e na fertilidade (Jéquier et al. 2002). Nós dosamos os níveis de leptina na cultura de macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos, e infectados ou não com *M. bovis* BCG. Não foram encontrados níveis significantes de leptina em nenhum dos grupos e tempos analisados, assim como na dosagem de sobrenadante de adipócitos (*Input*), indicando que a presença de infecção e sobrenadante, não leva à sua produção por macrófagos, *in vitro* (Figura 13).

Nós também dosamos os níveis de adiponectina na cultura de macrófagos neste mesmo modelo de estudo. A adiponectina é um hormônio peptídico produzido no tecido adiposo. Dentre suas funções, estão o controle da ingestão alimentar, homeostase energética, proteção contra aterosclerose e o aumento da sensibilidade à insulina. No entanto a obesidade pode levar a um aumento da massa do tecido adiposo, podendo acarretar em uma resistência à insulina. Estudos com roedores e humanos que tiveram uma dieta hipercalórica, mostraram que houve uma diminuição na concentração de adiponectina, levando a diminuição da concentração de insulina e no desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Weyer et al. 2001). Nossos resultados confirmaram essa diminuição, conforme mostram os dados do “Input” (Figura 13). Porém, interessante, a cultura de macrófagos estimulados com sobrenadante de adipócitos, levou ao aumento exacerbado da produção desta adipocina. Além disso, tal efeito foi inibido diante da presença de infecção com *Mycobacterium bovis* BCG (Figura 13).

De acordo com van Stijn et al. 2015, a adiponectina exerce efeitos anti-inflamatórios, antidiabéticos e antiaterogênicos através de seus receptores (AdipoRs), AdipoR1 e AdipoR2, sendo, este, um importante alvo terapêutico. A ativação clássica (M1) de macrófagos pode suprimir a expressão de AdipoR, enquanto que a ativação alternativa (M2) a preserva. Além disso, os fenótipos de polarização de macrófagos produziram respostas inflamatórias contrastantes para adiponectina. Nos macrófagos

M1, as citocinas pró-inflamatórias induzidas pela adiponectina, aumentaram os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 e AdipoR. Em contraste, em macrófagos M2, a adiponectina induziu IL-10 sem alterar a expressão de AdipoR ([van Stijn et al. 2015](#)). No entanto, fatores que regulam a expressão de AdipoR em monócitos / macrófagos são mal compreendidos e a importância da ativação de macrófagos polarizados no controle da expressão de AdipoR e da resposta inflamatória mediada por adiponectina ainda não foi investigada.

Estudos anteriores já demonstraram a produção de óxido nítrico por macrófagos perante ativação e estímulo de infecções, sendo este composto, portanto, também um marcador de polarização macrofágica ([Caruso et al. 2017](#); [Tsikas et al. 2017](#); [Bueno-Silva et al. 2017](#)). O óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares ([Queiroz et al. 1999](#)). Esta situação ativa a resposta imunológica, estimulando a síntese de i-NOS pelos macrófagos e, conseqüentemente, aumenta a concentração de óxido nítrico citotóxico que produzido em quantidades excessivas, destrói as células invasoras. No entanto, nossos resultados, demonstraram que a concentração de nitrito, medida indireta da produção de NO, foi estatisticamente diferente entre os grupos infectados e controle somente após 24 horas de infecção e estímulo com sobrenadante, começando a se observar um leve decréscimo no grupo infectado e estimulado após 48 horas de infecção. No tempo de 6 horas, também não houve diferenças significativas entre os grupos analisados, demonstrando possivelmente que presença de sobrenadante de adipócitos não interfere na produção de NO por macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (Figura 14).

Como já mencionado, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) infecta vários tipos de células, permitindo sua permanência no hospedeiro por longos períodos. Os adipócitos foram propostos como nichos para *M. tb* no estado latente, e por isso, entender a interação de patógenos virulentos com adipócitos é importante ([Jong et al. 2011](#)). Nós infectamos adipócitos diferenciados da linhagem NIH3T3-L1 e avaliamos os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 produzidos. Nossos resultados indicaram baixa produção de TNF- $\alpha$  pelos adipócitos, não sendo encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 16 A). Quanto à produção de IL-10, verificou-se que adipócitos produzem essa citocina, porém nenhuma diferença significativa foi

observada entre o grupo controle e os grupos infectados com MOI 1:1 ou 5:1 (Figura 16 B).

Estudos anteriores revelaram que cepas virulentas e atenuadas mantiveram estados não replicantes nos adipócitos até 10 dias após a infecção (Jong et al. 2011). Além disso, níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-6 e IL-17, e óxido nítrico apresentaram níveis mais baixos nos adipócitos infectados com cepas virulentas do que aqueles infectados com cepas atenuadas de *M. tb*. Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4, foram induzidas maioritariamente pelas cepas virulentas (Kim et al. 2011; Pooja et al. 2014). Em conjunto, estes dados indicam que micobactérias regulam a produção de citocinas e biogênese de corpúsculos lipídicos a fim de favorecer sua permanência na célula hospedeira e a evasão imunológica, sendo favorecida por fatores solúveis secretados por adipócitos.

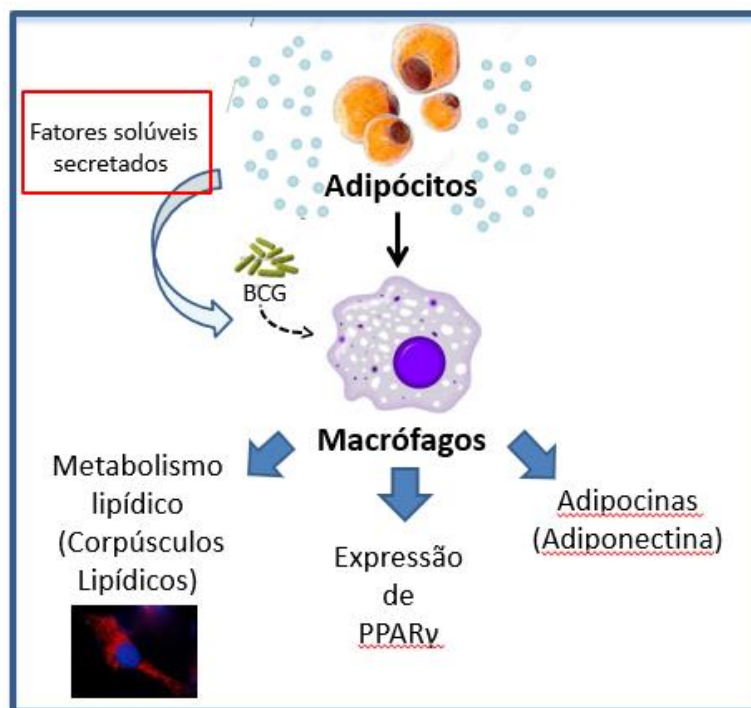
Nossos dados confirmam que a interação entre macrófagos e fatores secretados por adipócitos é um processo complexo e estudos mais aprofundados merecem ser feitos a fim de esclarecer, as relações entre adipócitos e macrófagos, no que diz respeito ao metabolismo de lipídios e resposta imune, frente a condições patológicas diversas, como por exemplo, em infecções micobacterianas.

## 5 – 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 *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro*, podemos chegar às seguintes conclusões:

- Confirmando estudos anteriores (Dissertação de mestrado – Amaral, L. P.), a diferenciação de adipócitos a partir de células NIH3T3-L1 é um processo eficiente com pico por volta do 17º dia diferenciação celular e que leva à mudanças na morfologia celular e acúmulo de corpúsculos lipídicos
- O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos leva ao aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, sendo este aumento potencializado pela presença de infecção com *M. bovis* BCG em MOI 5:1
- O estímulo de macrófagos com sobrenadante de adipócitos leva ao aumento da citocina TNF- $\alpha$ , sendo aumento potencializado pela infecção micobacteriana apenas nos tempos de 6 e 48 horas
- No tempo de 24 horas de infecção e estímulo com sobrenadante de adipócitos, os níveis de TNF- $\alpha$  decaí significativamente em MOI 5:1
- Os níveis de IL-10 aumentam significativamente apenas na presença de infecção (MOI 1:1) e estímulo com sobrenadante de adipócitos, apesar de um aumento ser notado para MOI 5:1 os valores não foram significativos
- Macrófagos peritoneais produziram níveis altíssimos de adiponectina na presença de sobrenadante de adipócitos e a infecção micobacteriana modulou negativamente esta produção
- A infecção por *M. bovis* BCG em macrófagos estimulados ou não com sobrenadante de adipócitos induziu a produção de nitrito em níveis similares e significativos, quando comparados aos seus controles apenas no tempo de 24 h

- A expressão de PPAR $\gamma$  é induzida pela infecção com *M. bovis* BCG no tempo de 6, 24 e 48 horas e é potencializada pelo estímulo com sobrenadante de adipócitos
- Adipócitos infectados produzem baixos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 e a presença de infecção com MOI 1:1 ou MOI 5:1 não interfere na síntese dessas citocinas



**Figura 17: Modulação de macrófagos infectados por fatores solúveis secretados por adipócitos:** Moléculas secretadas por adipócitos são reconhecidas por adipócitos levando a alterações no metabolismo lipídico, expressão de PPARgamma e síntese de adipocinas.

Em síntese, podemos notar que adipócitos possuem um papel modulador na ativação de macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, a partir de fatores solúveis secretados, o que leva a alterações no metabolismo lipídico, na expressão de fatores de transcrição específicos – PPAR $\gamma$ , síntese de citocinas inflamatórias, adipocinas e NO. Essas alterações no sistema imune do hospedeiro, durante a obesidade e as interações entre as células em questão, mostram-se de grande interesse na área, por se tratar de mecanismos e processos modulatórios ainda não muito bem compreendidos. No entanto, mais pesquisas ainda deverão ser realizadas, a fim de se buscar o melhor esclarecimento de como a obesidade pode modular a progressão de doenças infecciosas.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILHAUD G, HAUNER H. Development of white adipose tissue. In: Bray AGB, editor. Handbook of obesity: etiology and pathophysiology. Histochemistry & Cytochemistry, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

ALMEIDA, P. E.; CARNEIRO, A. C.; SILVA, A. R.; BOZZA, P. T. PPAR $\gamma$ . Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. PPAR Research, v. 2012, p. 01-07, 2012.

ALMEIDA, P. E.; ROQUE, R. R.; MAGALHÃES, K. G.; MATTOS, K. A.; TEIXEIRA, L.; MONTEIRO, C. M.; ALMEIDA, C. J. NETO, C. F.; RYFFEL, B.; QUEANIAUX, V. F. J.; BOZZA, P. T. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. Biochimica et Biophysica Acta. 2014

ALMEIDA, P. E.; SILVA, A. R.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; TOROCHSIK, D.; D'AVILA, H.; DEZSO, B.; MAGALHAES, K. G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; NAGY, L.; BOZZA, P. T. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. Journal of Immunology, v. 183, p. 1337-1345, 2009.

ALVARADO V. P. A; BERNAL, L.; PAIGE, C. A.; GROSICK, R. L.; MORACHO V. C, FERREIRA, D. W.; ULECIA, M. C.; ROMERO, S. E. A. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. Immunobiology. v. 17 p. 2985 - 30093-1, 2017.

AMITANI; MARIE; AKIHIRO; ASAKAWA; HARUKA; AMITANI; AKIO; INUI. 2013. "The Role of Leptin in the Control of Insulin-Glucose Axis." *Frontiers in Neuroscience*, v. 7, n. 7 APR, p. 1–12, doi:10.3389/fnins.2013.00051.

ARIMURA; NAOTO; TARO, H.; MASAYOSHI, I.; MAKOTO, S.; AND RYUICHIRO, S. "The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Regulates Expression of the Perilipin Gene in Adipocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 10070–76. 2004

BANDEIRA-MELO C, PHOOFOLO M, WELLER PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 2001b;276(25):22779-87.

BARTZ, R., ZEHMER, J.K., ZHU, M., CHEN, Y., SERRERO, G., ZHAO, Y., LIU, P., 2007b. Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* 6, 3256–3265.

BEIL WJ, WELLER PF, PEPPERCORN MA, GALLI SJ, DVORAK AM. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 1995;58(3):284-98

BERTOLA, A.; CIUCCI, T.; ROUSSEAU, D.; BOURLIER V.; DUFFAUT, C.; BONNAFOUS S. (2012), Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*, v. 61, n. 9, p. 2238–2247, 2012.

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins, na ancient Family of lipid droplets proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v. 6, p. 419-440, 2009.

BJORBAEK; CHRISTIAN. 2009. “Central Leptin Receptor Action and Resistance in Obesity.” *J Investig Med*, v. 57, n. 7, p. 789–794,

BLANQUER, R. M. M.; FRANCISCA. M. S.; JORDI, O.; PILAR, R.; ADAMO, V. 2015. “Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 116, n. 9, p. 2039–2048,

BOULANT, S., MONTSERRET, R., HOPE, R.G., RATINIER, M., TARGETT-ADAMS, P., LAVERGNE, J.-P., PENIN, F., MCLAUCHLAN, J., 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 281, 22236–22247. doi:10.1074/jbc.M601031200

BOZZA PT, BANDEIRA-MELO C. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(Suppl 1):113-120.

BOZZA, P. T. Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infection and immunity*, v. 75, p. 1507-1511, 2007.

BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies – Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, p.540-551, 2009.

BOZZA, P.T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids*, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.

BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and câncer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 82, p. 243- 250, 2011.

BRASAEMLE, D.L.; DOLIOS, G.; SHAPIRO, L.; WANG, R. 2004. Proteomic Analysis of Proteins Associated with Lipid Droplets of Basal and Lipolytically Stimulated 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem*, v. 279, p. 46835–46842..

BRASAEMLE, D.L., 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200

- BRASAEMLE, D.L., BARBER, T., WOLINS, N.E., SERRERO, G., BLANCHETTE-MACKIE, E.J., LONDOS, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249– 2263.
- BRASAEMLE, D.L., DOLIOS, G., SHAPIRO, L., WANG, R., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46835–46842. doi:10.1074/jbc.M409340200
- BUENO-SILVA, B. KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E. S.; CASARIN, R. C. V.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L.; MAYER, M. P. A. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 207:100-107. 2017.
- BUSSELL, R., ELIEZER, D., 2003. A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329, 763–778. doi:10.1016/s0022-2836(03)00520-5
- CANI PD, AMAR J, IGLESIAS MA, ET AL. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, p. 1761–1772, 2007.
- CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M.; BURCELIN, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, v. 57, p.1470- 1481, 2008.
- CAO, H.; GERHOLD, K.; MAYERS, J. R.; WIEST, M. M.; WATKINS, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* 2008, v. 134, n. 6, p. 933-944.
- CAROBIO, S.; CUENCA, S. R.; PUIG, A. V. Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. (2011), The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 14, n. 6, p. 520– 526.
- CARUSO, G.; FRESTA, C.G.; MARTINEZ-BECERRA, F.; ANTONIO, L.; JOHNSON, R. T.; DE CAMPOS, R. P. S.; SIEGEL, J. M.; WIJESINGHE, M. B.; LAZZARINO, G.; LUNTE, S. M. Carnosine modulates nitric oxide in stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *Mol Cell Biochem.* 431(1-2):197-210. 2017
- CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis in Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 176, n.5, p. 3087-3097, 2006.
- CARDONA PJ, LLATJOS R, GORDILLO S, DIAZ J, OJANGUREN I, ARIZA A, e cols. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 2000;52(2):156-63.
- CINTI S, MITCHELL G, BARBATELLI G, MURANO I, CERESI E, FALOIA E, ET AL. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 2347–2355,



2005.

CHRISTODOULIDES; CONSTANTINOS, AND ANTONIO VIDAL-PUIG. "PPARs and Adipocyte Function." *Molecular and Cellular Endocrinology* 318 (1–2): 61–68. 2010

COLEMAN RA, LEE DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, v. 43, n. 2, p. 134-76, 2004.

D'AVILA, H.; MELO, R. C. N.; PARREIRA, G. G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-

FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis in Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 176, n.5, p. 3087-3097, 2006.

D'ÁVILA, H., ALMEIDA, P. E., ROQUE, N. R., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infection and immunity*, v. 75, p. 1507-1511, 2007.

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO,

C. ; SILVA, A. R. ; MELO, R. C. N.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 951-961, 2011.

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

DEFRONZO, R. A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* 2004;(143):9-21. *Endocrinol Metab.* 2001, v. 86, n. 5, p. 1930-5.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 519-550, 2009.

FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 951-961, 2011.

FARMER SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, v.4, n. 4, p. 263- 73, 2006.

FAZOLINI, NARAYANA, P. B.; CRUZ, A. L. S.; WERNECK, M. B. F.; VIOL, J. P. B MONTEIRO, C. M. M.; BOZZA, P. T. 2015. "Leptin Activation of mTOR Pathway in Intestinal Epithelial Cell Triggers Lipid Droplet Formation, Cytokine Production and

Increased Cell Proliferation.” *Cell Cycle*, v. 14, n. 16, p. 2667–76, doi:10.1080/15384101.2015.1041684.

FERNÁNDEZ, R. J. M; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*, v. 24, n. 3, p. 278-301, 2003.

FLIER, J. S.; COOK, K. S.; USHER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science*, v. 237, n. 4813, p. 405-8, 1987.

FLYNN JL, CHAN J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 19:93-129. 2001.

FORNO, E. Asthma and Obesity: The Chicken, the Egg, or More Than One Beast? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Eur J Clin Nutr*. 2017.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ, A. J; MURUZÁBAL, F.J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 280, n. 6, p. 827-47, 2001.

FUJIMOTO T, KOGO H, ISHIGURO K, TAUCHI K, NOMURA R. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* 2001;152(5):1079-85.

FUJIMOTO Y, ITABE H, SAKAI J, MAKITA M, NODA J, MORI M, E COLS. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(1):47-59.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial.

GAAL, L. F. V.; MERTENS, I. L.; DEBLOCK, C. E. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, *Nature*, v. 444, p. 875-880.

GIMBRONE, M. A. JR. Vascular endothelium: An integrator of pathophysiologic stimuli in GONÇALVES, GABRIEL H. M.; WENJING, L.I.; ADRIANA, V. G.;

MARIANA, S. F.; CHRISTIAN, B. 2014. “Hypothalamic AgRP Neurons and the Central Melanocortin System Are Crucial Mediators of Leptin’s Anti-Diabetic Actions.” *Cell Reports*, v. 7, n. 4, p. 1093– 1103, doi:10.1001/jamasurg.2014.1086.Feasibility.

GREENBERG, ANDREW, S.; ROSALIND, A. C.; FREDRIC, B. K.; JAMES, L. M.; MARTIN S. O.; VISHWAJEET, P.; QING, W. Y.; HIDEAKI, M.; DOUGLAS, G. M. 2011. “The Role of Lipid Droplets in Metabolic Disease in Rodents and Humans.” *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 6, p. 2102–10

GREGOR, M. F; HOTAMISLIGIL, G. S. (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity, *Annu. Rev. Immunol*, v. 29, p. 415–445.

GRILLITSCH, K., CONNERTH, M., KÖFELER, H., ARREY, T.N., RIETSCHEL, B., WAGNER, B., KARAS M., DAUM, G., 2011. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets Proteome. *Biochim. Biophys.*

Acta - Mol. Cell Biol. Lipids 1811, 1165–1175.

GU, L.; OKADA, Y.; CLINTON, S.K.; GERARD, C.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P.; ROLLINS, B. J. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis

GUILHERME; ADILSON; JOSEPH, V. V.; PURI, V.; MICHAEL, P. C. 2008. "Adipocyte Dysfunctions Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Nature Reviews Molecular*, v. 9 n. 5, p. 367–77, doi:10.1038/nrm2391.Adipocyte.

GUILIN, L. I; CHUNYOU, N.; YAO, M. A.; LONG, J.; QIANZI, T.; XUEWEI, L.;

MINGZHOU, L. I.; HAIFENG, L. miR-26b Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation Through Targeting *PTEN*. *DNA and Cell Biology*, 2017.

HAJER, G. R.; HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. (2008), Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases, *European Heart Journal*, v. 29, p. 2959–2971.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav*, v. 83, n. 4, p. 653-8, 2004.

HELLMANN, J.; M. J.; ZHANG, Y.; TANG, M.; RANE, A. B.; SPITE, M.. "Increased Saturated Fatty Acids in Obesity Alter Resolution of Inflammation in Part by Stimulating Prostaglandin Production." *The Journal of Immunology*, v. 191 n. 3, p. 1383–92, 2013.

HIDAKA S, EBIHARA K, TANAKA T, SUGAWARA A, KAWACHI H, VINSON C,

HOTAMISLIGIL; GOKHAN, S. 2006. "Inflammation and Metabolic Disorders." *Nature*, v. 444 n. 7121, p. 860–67,

JEFFERY; ELISE; CHURCH, C. D.; HOLTRUP, B.; COLMAN, L.; RODEHEFFER, M. S. Rapid Depot-Specific Activation of Adipocyte Precursor Cells at the Onset of Obesity. *Nature Cell Biology*, v. 17, n. 4, p. 376–85, 2015.

JONG-SEOK, K.; MIN-JEO, R.; EUI-HONG, B.; WOO, S. K. JAKE, W.; KI-NAM, M.;

MINHO, S.; HWA-JUNG, K.; SUNG; J. S. Differential immune response of adipocytes to virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 1242-1251. 2013

KAHN, B. B; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473- 81. Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 45, p. 119-146, 2005.

KANG, Y. M; KIM, F.; LEE, W. J. Role of NO/VASP Signaling Pathway against Obesity- Related Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes Metab. J.* v. 2, p. 89-95, 2017.

KAPLAN, N. M. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, v. 149, n. 7, p. 1514-1520, 1989.

KIM J.A.; MONTAGNANI, M.; KOH, K. K.; QUON, M. J. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, v. 113, p. 1888-1904, 2006.

KUBOTA, K.; MORIYAMA, M.; FURUKAWA, S.; RAFIUL, H.; MARUSE, Y.; JINNO, T.; TANAKA, A.; OHTA, M.; ISHIGURO, N.; YAMAUCHI, M.; SAKAMOTO, M.; MAEHARA, T.; HAYASHIDA, J. N.; KAWANO, S.; KIYOSHIMA, T.; NAKAMURA, S. CD163+CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 1755, 2017.

KUERSCHNER L, MOESSINGER C, THIELE C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* 2008;9(3):338-52

KWON, O.; KI, W. K.; MIN, S. K. 2016. "Leptin Signalling Pathways in Hypothalamic Neurons." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (7). Springer International Publishing, p. 1457–1477.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 45:119-46. 2005.

LEFTEROVA; MARTINA, I.; ANDERS, K.; HAAKONSSON, M. A. L.; SUSANNE, M. "PPAR $\gamma$  and the Global Map of Adipogenesis and beyond." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25 (6): 293–302. 2014.

LEHMANN, J. M.; MOORE, L. B.; SMITH, O. T. A; WILKISON, W. O.; WILLSON, T. M. KLIEWER, S. A. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, v. 270, n. 22, p. 12953-6, 1995.

LOLME`DE, K., C. DUFFAUT, A. ZAKAROFF-GIRARD, AND A. BOULOUMIE´. 2011. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*, v. 37, p. 283–290. 2011.

MAHAJAN, S.; BHASKAR, N.; KAUR, H.; PANDEY, R.; MANHAS, S. Lipid Droplets: a Dynamic Organelle in Health and Disease. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 173 – 184, 2015.

MARTIN S, PARTON RG. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(2):163-74. 2005.

MARTIN, S. AND PARTON, R. G.. Lipid droplets: A unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 5, p. 373-8, 2006.

MASTROCOLA, R.; ARAGNO, M.; ALLOATTI, G.; COLLINO, M.; PENNA, C.; PAGLIARO, P. Metaflammation: tissue-specific alterations of the NLRP3 inflammasome platform. *Curr Med Chem*. 2017.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. G.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S.; PINHEIRO, R. O.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C.; BOZZA, P. T. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.* 187(5):2548-58. 2011.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. 2010. "Adipokine Dysregulation, Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Syndrome." *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 314, n. 1, p. 1–16. doi:10.1016/j.mce.2009.07.031.

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

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALMEIDA, P.E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A. S.; REZENDE, A. P.; CASTRO FARIA-NETO, H.; BOZZA; P. T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin- dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. v..283, p. 2203-2210, 2008.

MELO, R. C. N.; PAGANOTI, G. F.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. The Internal Architecture of Leukocyte Lipid body Organelles Captured by Three- Dimensional Electron Microscopy Tomography. *PlosOne*, v. 8, n.3, p. 01-12, 2013.

MELO, R. C. N. et al. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue cell*, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2003.

MELO, R. C. N.; D'AVILA, H.; WAN, H.-C.; BOZZA, P. T.; DVORAK, A. M.; MESTAS, J. and C. C. Hughes. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol*, v. 172, p. 2731–2738. 2004.

MORENO C, MEHLERT A, LAMB J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 1988;74(2):206-10.

MORENO C, TAVERNE J, MEHLERT A, BATE CA, BREALEY RJ, MEAGER A, e cols. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 1989;76(2):240- 5.

MS. Ministério da Saúde. Vigitel 2014.

<=<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17445-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta>>=>. Acessado em 14/02/2016.

MURPHY DJ, VANCE J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 1999;24(3):109-15. 1999.

NAGY, L.; BOZZA, P. T. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *Journal of Immunology*, v. 183, p. 1337-1345, 2009.

NAKARAI 2012 Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: Potential link. .

NGUYEN, M.T.; FAVEL, Y. S.; NGUYEN, A. K.; REICHART, D.; SCOTT, P. A.; JENN, A. R.; GLASS, C. K.; NEELS, J. G.; OLEFSKY J. M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and jnk-dependent pathways. *J Biol Chem*, v. 282, p. 35279-35292, 2007.

NISHIMURA F, IWAMOTO Y AND SOGA Y. Periodontal host responswith diabetes. *Periodontology* 2000, v. 43, p. 245–253, 2007.

NISHIMURA F, TANIGUCHI A, IWAMOTO Y, et al. Porphyromonas gingivalis infection is associated with elevated C-reactive protein

NOURIAN, M.; CHALESHI, V.; PISHKAR, L.; AZIMZADEH, P.; BARADARAN, G. S.; BALAI, H.; ALINAGHI, S.; SHAHROKH, S.; ASADZADEH; AGHDAEI, H.; ZALI, M. R. 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*, v. 6, n. 6, p. 698-70, 2017.

NTAMBI JM, YOUNG-CHEUL K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.*, v. 130, n. 12, p. 3122-6, 2000.

OGDEN CL, CARROLL MD, KIT B.K., AND FLEGAL K.M., (2014), Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, *JAMA*, v. 311, n. 8, p. 806–814, 2011- 2012.

OGLESBY, A. K.; SECNIK, K.; BARRON, J.; AL-ZAKWANI, I.; LAGE, M. J. The association between diabetes related medical costs and glycemic control: a retrospective analysis. *Cost Eff Resour Alloc*, v. 4, n. 1, 2006.

OKAMOTO H, MIZUNO K, HORIO T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. *Journal of dermatological science*, v. 31, p. 119–128, 2003.

PACHECO P, BOZZA FA, GOMES RN, BOZZA M, WELLER PF, CASTRO-FARIANETO HC, E COLS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002;169(11):6498-506. 2002.

PANIAGUA, J. A. 2016. "Nutrition, Insulin Resistance and Dysfunctional Adipose Tissue Determine the Different Components of Metabolic Syndrome." *World Journal of Diabetes*, v. 7,n. 19, p. 483–514, doi:10.4239/wjd.v7.i19.483.

PISCHON, T.; GIRMAN, C. J.; HOTAMISLIGIL, G. S.; RIFAI, N.; HU, F. B; RIMM, E. B. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*, v. 291, n. 14, p. 1730-7, 2004.

POOJA, A.; SHAHEB R. K.; SUBASH C. V.; MUHEEB, B.; KAVITA, S.; KALYAN, M.; ANIL, N. G.; SOHAIL, A.; MANJU, Y. K. Mycobacterium tuberculosis persistence in various adipose depots of infected mice and the effect of anti-tubercular therapy. *Microbes and Infection*. 1-10. (2014)

POPKIN BM, (2006), Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am. J. Clin. Nutr*, v. 84, n. 2, p. 289–298, 2006.

POTENZA, M. A.; Nacci, C.; Salvia, M. A.; SGARRA, L.; COLLINO, M.; MONTAGNANI, Targeting endothelial metaflammation to counteract diabetes cardiovascular risk: current and perspective therapeutic options. *Pharmacological Research*, v. 1, p.41, 2017.

RAJARAM, M. V.; BROOKS, M. N.; MORRIS, J. D.; TORRELLES, J. B.; AZAD, A.

K.; SCHLESINGER, L. S. Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol.* 185(2):929-42. 2010.

RAJARAM, M. V.; NI, B.; DODD, C. E.; SCHLESINGER, L. S. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol.* 26(6):471-85. 2014.

RAY, I.; SUSHIL, K.; MAHATA; RAJAT, K. De. 2016. "Obesity: An Immunometabolic Perspective." *Frontiers in Endocrinology*, v. 7 (December), p. 1–9, doi:10.3389/fendo.2016.00157.

REGAZZETTI, C.; PERALDI, P.; GREMEAUX, T.; NAJEM, L. R, BEN, S. I.; CORMONT, M. (2009), Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*, v. 58, n. 1, p. 95–103, 2009.

RICOTE M, LI AC, WILLSON TM, KELLY CJ, GLASS CK. The peroxisome proliferator- activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391(6662):79-82. 1998.

RILEY RL, MILLS CC, NYKA W, WEINSTOCK N, STOREY PB, SULTAN LU, E COLS. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959. *Am J Epidemiol* 1995;142(1):3-14.

RITCHIE, R. H.; DRUMMOND, G. R; SOBEY, C. G. S.; KEMP-HARPER, T. M. B. K. The opposing roles of no and

ROBENEK MJ, SEVERS NJ, SCHLATTMANN K, PLENZ G, ZIMMER KP, TROYER D, E COLS. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J*;18(7):866-8. 2004.

ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M. W.; GONZALEZ, F. J. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, v. 16, n. 1, p. 22-6, 2002.

SAXENA, M.; SRIVASTAVA, N.; BANERJEE, M. Association of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep.* 40(11):6271-9. 2013

SHELLER, E. L.; JUNHUI, S. M. I.; DISHOWITZ, F. N. S.; KURT, D. H. PAUL, H. K.

“Leptin Functions Peripherally to Regulate Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells.” *Stem Cells*, v. 28, n. 6, p. 1071–80. 2010.

SCHOPFER, F. J.; LIN, Y.; BAKER, P. R.; CUI, T.; GARCIA, B. M. ZHANG, J.. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

SCHOONJANS K, MARTIN G, STAELS B, AUWERX J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 1997;8(3):159-66.

SCHOONJANS K, STAELS B, AUWERX J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302(2):93-109

SHEN, M.; ZHOU, L.; ZHOU, P.; ZHOU, W.; LIN, X. Lymphotoxin  $\beta$  receptor activation promotes mRNA expression of RelA and pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in bladder cancer cells. *Mol Med Rep*, 2017.

SHI H, KOKOEVA MV, INOUE K, TZAMELI I, YIN H AND FLIER JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.

SOUSA, M.; BRÁS, S.; CARMEN, L. M.; ADELINO. O papel da leptina na regulação da homeostasia energética. *Acta Med Port*, v. 22, p. 291-298, 2009.

SPALDING KL, ARNER E, WESTERMARK PO, BERNARD S, BUCHHOLZ BA, BERGMANN O, ET AL. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, v. 453, n. 7196, p. 783-7, 2008.

SPALDING; KIRSTY, L.; ERIK A.; PÅL O. W.; BERNARD, S.; BUCHHOLZ, B. A; BERGMANN, O.; BLOMQVIST, L. Dynamics of Fat Cell Turnover in Humans. *Nature*, v. 453 n. 7196, p. 783–87, 2008.

STRAPAGIEL D, KASZTALSKA K, DRUSZCZYNSKA M, KOWALEWICZ-KULBAT M, VRBA A, MATUSIAK A, E COLS. Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):353-9.

SUGANAMI, T.; MUKOYAMA, M.; SUGAWARA, A.; MORI, K.; NAGAE, T.; KASAHARA M.; YAHATA, K.; MAKINO, H.; FUJINAGA, Y.; OGAWA, Y.; TANAKA, I.; NAKAO, K. Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates immunemediated renal injury. *J Am Soc Nephrol*, v. 12, p. 2652–2663, 2001.

SUN, S.; JI, Y.; KERSTEN, S.; QI, L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu.Rev.Nutri*, v. 32, p. 261–286. 2012.

TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, v. 4, p. 1-14 2013.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The



- TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*;79(7):1147-56. 1994.
- TONTONOZ PN, L.; ALVAREZ, J.G.; THOMAZY, V.A.; EVANS, R.M. PPARgamma promotes monocytes/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*;93(2):241-252. 1998.
- HARTUNG T, E COLS. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*;281(41):31002-11. 2006.
- TRIANTAFILOU M, GAMPER FG, LEPPER PM, MOURATIS MA, SCHUMANN C, HAROKOPAKIS E, E COLS. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol* ;9(8):2030-9, 2007.
- TSIKAS, D.; HANFF, E.; BRUNNER, G. Helicobacter pylori, Its Urease and Carbonic Anhydrases, and Macrophage Nitric Oxide Synthase. *Trends Microbiol*. 25(8):601-602. 2017.
- TZAMELI, I.; FANG, H.; OLLERO, M.; SHI, H.; HAMM, J. K.; KIEVIT, P. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, v. 279 n. 34 p. 36093-102, 2004.
- van Stijn, C.M.; Kim, J.; Lusic, A. J.; Barish, G. D.; Tangirala, R. K. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. 29(2):636-49. 2015
- VANDANMAGSAR, B.; YOUM Y. H.; RAVUSSIN, A.; GALGANI J. E.; STADLER, K.; MYNATT, R. L.; RAVUSSIN, E.; STEPHENS, J. M.; DIXIT, V. D. The nlrp3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*, v. 17 p. 179-188, 2011.
- VARELA, L.; TAMAS, L. H. 2012. "Leptin and Insulin Pathways in POMC and AgRP Neurons That Modulate Energy Balance and Glucose Homeostasis." *EMBO Reports*, v. 13, n. 12, Nature Publishing Group, p. 1079-86, doi:10.1038/embor.2012.174.
- WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, v. 81, n. 1, p. 687-714.
- WEI, L.; KUANGFA, L. I.; XUELI, P.; BIANQIN, G.; MIN, S. U.; YUNXIU, H.; NIAN, W. 2016. "Leptin Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer via the Upregulation of Pyruvate Kinase M2." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35 (1). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*: 166. doi:10.1186/s13046-016-0446-4.
- WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L. FERRANTE, A. W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose

WELLER, P.F. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function and Current Imaging Techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R.E, ET AL. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(5):1930-5. 2001.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R. E. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin.*

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. What are overweight and obesity? Fact sheet N°311. Updated March 2015; <=<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>>.Acessado: 14/02/2016.

WOLINS, N. E. Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. *Adipocyte*, v .2, n. 2, p. 80-86, 2013.

WOOD, I.S.; DE, H. F. P.; WANG, B.; TRAYHURN, P. (2009) Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc.Nutr.Soc*, v. 68, p. 370-377.

WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R. H.; ADELMANT, G.; TROY, A. E. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a

XU, M. and WANG, X. Critical roles of mucin-1 in sensitivity of lung cancer cells to tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. *Cell Biol Toxicol*, 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. *Cell Physiol Biochem*, v. 42, n. 1, p.91-102, 2017.

YAMASHITA A, SOGA Y, IWAMOTO Y, ET AL. DNA microarray analyses

YOO, S.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Beauvericin, a cyclic peptide, inhibits inflammatory responses in macrophages by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway. *Korean J Physiol Pharmacol.* 21(4):449-456. 2017

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I.; TSCHOPP, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, V. 11, p. 136-140, 2010.

ZHU, W.; CHENG, K. K.; VANHOUTTE, P. M.; LAM, K. S.; XU, A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci*

(Lond), v. 114, n. 5, p. 361-74, 2008.

ZHU, Y.; ALVARES, K.; HUANG, Q.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem*, v. 268, n. 36, p. 26817-20, 1993.

ZINGARELLI B, SHEEHAN M, HAKE PW, O'CONNOR M, DENENBERG A, COOK JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy Delta(12,14)- prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 2003;171(12):6827-37.

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