

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

MINISTÉRIO DA SAÚDE

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

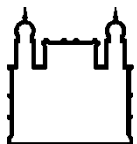
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

O PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PARA A IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE

SABRINA ALVES DOS REIS

Rio de Janeiro

2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*SABRINA ALVES DOS REIS*

O papel do tecido adiposo para a imunopatologia da hanseníase

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutora em Biologia Celular e  
Molecular.

**Orientador:**

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

**RIO DE JANEIRO**

**2021**

Alves dos Reis, Sabrina.

O PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PARA A IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE / Sabrina Alves dos Reis. - Rio de Janeiro, 2021.

128 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Flavio Alves Lara.

Bibliografia: f. 110-127

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. Tecido Adiposo. 4. Adipócitos. 5. Metabolismo lipídico. I. Título.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTORA: SABRINA ALVES DOS REIS**

**O PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PARA A IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Alves Lara**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro – Instituto Oswaldo Cruz - **Revisora**

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro – Instituto Oswaldo Cruz - **Presidente**

Prof. Dra. Georgia Correa Atella – Universidade Federal do Rio de Janeiro - **Membro**

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira - Universidade Federal do Rio de Janeiro – **Membro**

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira - Instituto Oswaldo Cruz - **Suplente**

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna - Universidade Federal do Rio de Janeiro - **Suplente**

Rio de Janeiro, 19 de abril de 2021.

*Aos meus familiares e amigos que nunca deixaram de apoiar e acreditar em toda minha caminhada, dedico mais esta importante conquista.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer por todas as experiências e oportunidades que fizeram parte da construção de minha formação acadêmica e, acima disso, gratidão pelo olhar de um Ser Supremo visto de diferentes formas, mas que em comum se apresenta como uma força maior da natureza, que nos capacita para seguir nossos caminhos, assumir responsabilidades e enfrentar desafios.

Toda caminhada possui seus percalços, mas felizmente nunca percorremos sozinhos. Agradeço o apoio de pessoas importantes que permitiram com que cada passo dado fosse mais leve e recompensador.

Gratidão à minha família, especialmente minha mãe, Adriana, exemplo de mulher batalhadora que nunca mediu esforços para oferecer conforto e oportunidades aos filhos, a quem dedico toda minha trajetória, pois foi sempre ponte para eu seguir caminhos muitas vezes nunca trilhados anteriormente em nossa família. Destaco também meu agradecimento ao meu melhor amigo e companheiro Marcus por ser sempre a força estrutural e emocional em minha vida. Agradeço a todos os familiares que sempre apoiam e confiam em minhas escolhas.

Obrigada ao meu orientador Dr. Flavio Lara por confiar em minhas habilidades e dedicação, quem ajudou a desenvolver minha trajetória acadêmica desde a iniciação científica até este momento. Ao nosso grupo sempre bastante unido e generosos uns com os outros, atributos importantes para o progresso de cada integrante em um grupo de trabalho, Débora, Diego, Jéssica, Karina e Tiago, meu muito obrigada.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Celular onde pude aprender, ensinar e sempre compartilhar conhecimentos e experiências durante o desenvolvimento de meu projeto de pesquisa. Obrigada a todos do grupo que sempre tornaram o ambiente de trabalho mais alegre e colaborativo. Agradeço também por toda disponibilidade e mentoria das pesquisadoras do laboratório Dra. Maria Cristina Pessolani, Dra. Cristiana de Macedo, Dra. Letícia Lery e Dra. Marcia Berredo. Gratidão por todos os integrantes do Pavilhão Hanseníase e colaboradores externos que de alguma forma contribuíram para o bom andamento de minhas atividades.

Estendo meus agradecimentos também à Dra. Jyothi Nagajyothi e sua equipe no Public Health Research Institute, da universidade Rutgers, EUA, por me receber em seu laboratório

durante o período sanduíche de meu doutorado. Sem dúvidas possibilitou uma das experiências mais relevantes em minha formação profissional e também pessoal. Bem como agradecer a todas as pessoas que pude conhecer e receber importante apoio durante minha estada no exterior.

Muito obrigada aos componentes da banca de defesa de minha tese, à Dra. Clarissa Maya-Monteiro pela revisão do trabalho, à Dra. Roberta Olmo, Dr. Marcus Oliveira, Dra. Georgia Atella, Dra. Verônica Schmitz e Dr. Mauro Sola-Penna por aceitarem participar da avaliação de minha defesa.

Ao Instituto Oswaldo Cruz por toda oportunidade de aprendizado acadêmico.

À CAPES pelo suporte financeiro importante e necessário para a formação acadêmica e científica.

Importante acrescentar minha gratidão pela possibilidade de conclusão desta etapa em minha formação acadêmica e científica durante um momento tão delicado globalmente devido a pandemia de Covid-19. Vivenciar este momento tão marcante na história da humanidade nos reafirma a importância da ciência para a vida, e o quanto nós, como comunidade científica, precisamos sempre expandir o conhecimento para além dos muros acadêmicos. Toda solidariedade àqueles que infelizmente tiveram seus sonhos interrompidos.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

(Albert Einstein, físico e matemático)



## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica e sistêmica causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*, que afeta a pele e os nervos periféricos pela infecção a macrófagos e células de Schwann. Mesmo curável, a patologia ainda representa um problema de saúde pública em alguns países, estando o Brasil em segundo lugar no ranking mundial de detecção de novos casos da doença. Apesar de ser uma doença milenar, o entendimento do desenvolvimento da infecção pelo *M. leprae* ainda é limitado por se tratar de um microrganismo não cultivável *in vitro*, tornando os avanços científicos lentos e de custo elevado. É conhecida a importância do metabolismo lipídico da célula hospedeira para a sobrevivência intracelular do patógeno em macrófagos e células de Schwann. Os adipócitos, células que constituem o tecido adiposo subcutâneo especializadas no armazenamento lipídico, no entanto, nunca haviam sido investigados como alvo de infecção pelo *M. leprae*. Neste estudo, analisamos o envolvimento das células adiposas como potencial sítio de infecção do patógeno. Foram utilizados como modelo de infecção experimental *in vitro* fibroblastos murinos 3T3-L1 diferenciados a adipócitos. A modulação lipídica nos adipócitos foi analisada, assim como a expressão gênica e a produção de proteínas envolvidas no processo de lipólise. Um modelo piloto de infecção *in vivo* em camundongos com injeção direta de *M. leprae* no tecido adiposo inguinal foi utilizado para a investigação de alterações metabólicas induzidas após a infecção do tecido. A viabilidade da micobactéria no ambiente dos adipócitos e de macrófagos expostos ao meio condicionado por adipócitos foi mensurada, bem como a análise de genes de latência micobacterianos durante a infecção. A expressão gênica de fatores envolvidos na resposta de macrófagos frente a estímulos dos adipócitos também foi investigada. Os resultados demonstram uma intensa mobilização lipídica nos adipócitos quando infectados pelo *M. leprae*, com efluxo de colesterol. Experimentos *in vivo* demonstram mudanças metabólicas após infecção do tecido adiposo inguinal de camundongos, como o aumento do efluxo de colesterol para o sangue corroborando com os dados *in vitro*, além de maior reserva de triacilglicerídeos no fígado dos animais. Além disso, foi observado que o meio condicionado por adipócitos afeta a viabilidade do *M. leprae* no interior de macrófagos, modulando a resposta imune destas células. Este trabalho apresenta o tecido adiposo como um importante sítio de infecção para o *M. leprae* até então desconhecido, demonstrando o potencial do tecido na elucidação dos mecanismos patológicos desencadeados na hanseníase.

## ABSTRACT

Leprosy is a chronic and systemic infectious disease caused by the intracellular bacillus *Mycobacterium leprae*, which affects the skin and peripheral nerves due to its infection to macrophages and Schwann cells. Although curable, this pathology is still recognized as a public health issue in some countries. Brazil stands second place on the global ranking of new cases detection. Despite being a millenary disease, the understanding about the development of *M. leprae* infection remains limited due to the fact that it is a non-cultivable microorganism, what makes any scientific advances a challenge. The importance of host cell lipid metabolism for the intracellular survival of this pathogen in macrophages and Schwann cells is known. Adipocytes, specialized cells in lipid storage present in subcutaneous adipose tissue, however, have never been investigated as a target for *M. leprae* infection. In this study, it was analyzed the involvement of fat cells as a potential infection site for the pathogen. Murine 3T3-L1 derived adipocytes infected with *M. leprae* were used as *in vitro* experimental model. Lipid modulation in adipocytes was analyzed. Gene expression and the production of proteins, enzymes, adipokines, and transcription factors involved in the lipolysis process were evaluated by qPCR and western blotting. A model of *in vivo* infection using injection of *M. leprae* in mice inguinal adipose tissue was used to investigate metabolic changes. Mycobacteria viability was determined inside adipocytes, in macrophages exposed to adipocytes conditioned medium, as well as the analysis of latency genes from mycobacteria. Gene expression of factors involved in the macrophage response after adipocytes conditioned medium stimuli was also investigated. The results demonstrate an intense lipid mobilization in adipocytes after *M. leprae* infection, followed by significative cholesterol efflux. *In vivo* experiments demonstrate metabolic changes after infection in mice inguinal adipose tissue, such as increased cholesterol efflux into the blood corroborating with *in vitro* data, in addition to high levels of triglycerides in the murine livers. Also, it was observed that the conditioned medium from adipocytes can affect the viability of *M. leprae* infecting macrophages, modulating the immune response. This work presents adipose tissue as an important, and previously unknown, infection site for *M. leprae* able to contribute to the understanding of pathological mechanisms triggered in leprosy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Ilustração das observações de células ricas em citosol.....	15
Figura 1.2: Ilustração das observações de células com diversos glóbulos de gordura.....	16
Figura 1.3: Representação esquemática de adipócito branco.....	18
Figura 1.4: Representação esquemática de adipócito marrom.....	19
Figura 1.5: Depósitos de tecido adiposo branco.....	20
Figura 1.6: Representação esquemática do processo de lipólise.....	24
Figura 1.7: Modelo lipoestático de regulação da gordura corporal.....	27
Figura 1.8: Morfologia de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	51
Figura 1.9: Classificações clínicas da hanseníase e perfil de resposta imunológica do hospedeiro.....	54
Figura 1.10: Presença de antígenos de <i>Mycobacterium leprae</i> em fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar.....	60
Figura 5.1: Quantificação de corpúsculos lipídicos.....	77
Figura 5.2: Investigação da atividade de enzimas lipolíticas em culturas infectadas por <i>Mycobacterium leprae</i> .....	78
Figura 5.3: Análise do efluxo de colesterol radioativo.....	79
Figura 5.4: Análise do conteúdo de triacilglicerol.....	80
Figura 5.5: Dosagem de colesterol total em sobrenadante celular.....	81
Figura 5.6: Dosagem dos níveis séricos de colesterol total.....	82
Figura 5.7: Dosagem dos níveis séricos de glicose.....	82
Figura 5.8: Dosagem dos níveis de triglicerídeo.....	83
Figura 5.9: Análise de qPCR para receptor adrenérgico $\beta 1$ em adipócitos 3T3-L1.....	84
Figura 5.10: Análise de qPCR para lipase de triglicerídeo em tecido adiposo (ATGL) e lipase hormônio sensível (HSL) em adipócitos 3T3-L1.....	85
Figura 5.11: Análise de qPCR para perilipina 1 em adipócitos 3T3-L1.....	86
Figura 5.12: Análise de qPCR para receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR $\gamma$ ) em adipócitos 3T3-L1.....	87

Figura 5.13: Análise de qPCR para o transportador de cassetes de ligação ao ATP A1 (ABCA1) e o de subfamília G (ABCG1) em adipócitos 3T3-L1.....	88
Figura 5.14: Análise de qPCR para adiponectina e leptina em adipócitos 3T3-L1.....	89
Figura 5.15: Análise de qPCR para a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) em adipócitos 3T3-L1.....	90
Figura 5.16: Análise por imunoblotting do receptor adrenérgico $\beta$ 1 em adipócitos.....	91
Figura 5.17: Análise por imunoblotting da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) em adipócitos.....	92
Figura 5.18: Análise por imunoblotting de lipase hormônio sensível (HSL) em adipócitos.....	93
Figura 5.19: Análise por imunoblotting de perilipina 1 em adipócitos.....	94
Figura 5.20: Análise por imunoblotting de receptores ativados por proliferador de peroxissoma alpha (PPAR $\alpha$ ) e gamma (PPAR $\gamma$ ) em adipócitos.....	95
Figura 5.21: Viabilidade do <i>Mycobacterium leprae</i> em culturas de adipócitos 3T3-L1.....	96
Figura 5.22: Viabilidade do <i>Mycobacterium leprae</i> em culturas de macrófagos Raw 264.7.....	97
Figura 5.23: Análise de qPCR para genes de estresse oxidativo em macrófagos.....	98
Figura 5.24: Análise de qPCR para genes de citocinas em macrófagos.....	99
Figura 5.25: Análise de qPCR para genes de latência de <i>Mycobacterium leprae</i> em macrófagos.....	100
Figura 5.26: Análise de qPCR para genes de latência de <i>Mycobacterium leprae</i> em adipócitos.....	101
Figura 5.27: Investigação de antígenos de <i>Mycobacterium leprae</i> em tecido adiposo subcutâneo <i>in vivo</i> .....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Outras adipocinas produzidas pelo tecido adiposo.....	30
Tabela 4.1: Sequências dos <i>primers</i> .....	69
Tabela 4.2: Lista de Anticorpos.....	74

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Tecido adiposo, mais que uma simples reserva energética .....	14
1.1.1 Hipóteses iniciais sobre a morfologia do tecido adiposo.....	14
1.1.2 Descrição do tecido adiposo em mamíferos .....	17
1.1.3 Caracterização do tecido adiposo branco.....	19
1.1.4 Metabolismo dos adipócitos .....	21
1.1.4.1 Lipólise .....	22
1.1.4.2 Regulação da lipólise .....	24
1.1.5 Função endócrina do tecido adiposo.....	27
1.1.5.1 Leptina .....	28
1.1.5.2 Adiponectina.....	29
1.1.5.3 Outras adipocinas.....	31
1.1.5.4 Ácidos graxos livres: moléculas sinalizadoras não proteicas produzidas pelo tecido adiposo branco.....	33
1.1.6 O tecido adiposo como órgão imunológico .....	33
1.1.7 Tecido adiposo e doenças infecciosas.....	35
1.1.7.1 Protozoários: <i>Trypanosoma spp</i> , <i>Plasmodium spp</i> .....	37
1.1.7.2 Vírus: HIV, Citomegalovírus e Influenza A .....	41
1.1.7.3 Bactérias: <i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	45
1.2 Hanseníase .....	49
1.2.1 Etiologia.....	50
1.2.2 Epidemiologia.....	51
1.2.3 Patogênese .....	52
1.2.4 Tratamento .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.2.5 <i>Mycobacterium leprae</i> e o metabolismo lipídico.....	55
2. JUSTIFICATIVA.....	60
3. OBJETIVO GERAL .....	61

3.1	Objetivos Específicos: .....	61
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
4.1	Grupo de Estudo .....	63
4.2	Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	63
4.3	Cultura de Células de Linhagem 3T3-L1 .....	64
4.4	Cultura de células de linhagem Raw 264.7 .....	64
4.5	Extração e purificação de ácidos nucleicos .....	65
4.6	Síntese de cDNA – RT-PCR .....	66
4.7	PCR em tempo real para determinação da viabilidade micobacteriana e análise de expressão gênica .....	66
4.8	Análise dos dados obtidos a partir do PCR em tempo real .....	67
4.9	Microscopia de Fluorescência .....	68
4.10	Imunofluorescência .....	69
4.11	Incorporação de lipídeos radioativos .....	70
4.12	Imunoblotting .....	71
4.13	Análises metabólicas .....	73
5.	RESULTADOS .....	75
5.1	Modulação lipídica em adipócitos infectados por <i>Mycobacterium leprae</i> .....	75
5.2	Análises metabólicas em modelo <i>in vivo</i> de injeção de <i>Mycobacterium leprae</i> em tecido adiposo inguinal .....	79
5.3	Análises de expressão gênica de proteínas da via lipolítica nos adipócitos .....	81
5.4	Análises de expressão gênica de adipocinas .....	86
5.5	Análise da produção de proteínas do metabolismo lipídico e adipocinas nos adipócitos .....	88
5.6	Viabilidade de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	93
5.7	Análise de modulação gênica em macrófagos .....	95
5.8	Investigação de genes de latência em <i>Mycobacterium leprae</i> .....	96
5.9	Investigação <i>in vivo</i> de acesso do <i>M. leprae</i> em tecido adiposo subcutâneo .....	98
6.	DISCUSSÃO .....	100
7.	CONCLUSÕES .....	109
8.	REFERÊNCIAS .....	110
	ANEXO I - Representação esquemática das hipóteses do modelo estudado no trabalho. ....	128

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tecido adiposo, mais que uma simples reserva energética

### 1.1.1 Hipóteses iniciais sobre a morfologia do tecido adiposo

Questionamentos sobre como a gordura era estocada em mamíferos eram frequentes entre pesquisadores em meados do século XIX, com diversas propostas conflitantes. As principais propostas descreviam que a gordura se acumulava em células não especializadas no tecido conjuntivo que possuíam forma multilocular semelhante a ‘amoras’ ou ainda que as células vagavam pelo plasma coletando gordura e se acumulavam no tecido conjuntivo. Outra visão postulava o conceito que melhor compreende o que entendemos atualmente a respeito dessas células, então os adipócitos, que ocupavam um tecido ‘glandular’ especializado. Porém esta última hipótese ainda era a menos atraente no início do século XX, como descrito em uma abrangente revisão de literatura publicada em 1901 sobre os estudos da morfologia do tecido adiposo (SHAW, 1901).

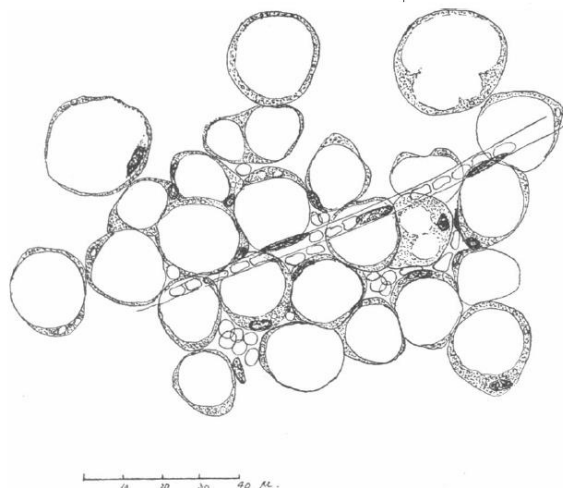
Ao analisar naquela época a literatura sobre o desenvolvimento da gordura no corpo, era evidente que as opiniões eram muito divididas, mas duas importantes contribuições foram realizadas. De um lado pesquisadores que insistiam em acreditar que as células de gordura eram desenvolvidas a partir de células especializadas reservadas para sintetizar e acumular gordura. Do outro lado, que as células de gordura não formavam uma estrutura específica, mas que a gordura era armazenada em células espalhadas por toda parte, e eram constituintes do tecido conjuntivo. Todd e Bowman (1845, *apud* SHAW, 1901) afirmavam que o tecido adiposo e o tecido conjuntivo deveriam ser considerados tecidos distintos e independentes. Em 1856, Kolliker (1856, *apud* SHAW, 1901) descreveu grandes células poligonais granuladas, mas com citosol (na época chamado protoplasma) claro ocorrendo no mesentério e ao redor dos rins em espécimes de gatos filhotes, contendo glóbulos de gordura. Kolliker então considerou que estas células poligonais eram primitivas, e que formavam estruturas definidas que, por sua aparência, deveriam ser consideradas como glândulas, e assim ele as nomeou.

Por outro lado, em 1866 Czajewicz (1866, *apud* SHAW, 1901) publicou observações na formação da gordura e opinou que a gordura era depositada em células do tecido conjuntivo,



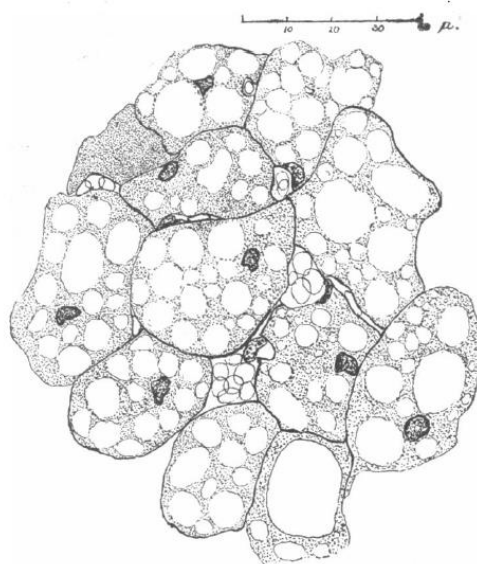
mas não um grupo especial delas, e que, em caso de excesso nutricional, até as células epiteliais do mesentério poderiam ser preenchidas com glóbulos de gordura. Depois, Flemming (1870, *apud* SHAW, 1901) publicou suas observações sobre o desenvolvimento de gordura no tecido subcutâneo e no mesentérico. Em seus trabalhos ele afirmava que a gordura era depositada em células fixadas no tecido conjuntivo. Como resultado do jejum, a gordura era removida destas células e as células originais do tecido conjuntivo se multiplicavam. No mesmo ano, Toldt (1870, *apud* SHAW, 1901) defendeu enfaticamente a existência de órgãos definidos formadores de gordura, sendo encontrados em gatos filhotes e coelhos jovens abaixo da pele, entre os músculos, no pescoço, em volta de várias articulações e próximo aos rins. As células destas glândulas, antes da gordura ser formada dentro delas, eram grandes com forma variável e granuladas. O sistema capilar altamente desenvolvido que formava uma rede entre essas ‘glândulas gordurosas’ chamavam sua atenção.

Após suas observações, Waldeyer (1875, *apud* SHAW, 1901) concluiu que as células de gordura eram formadas de acordo com as observações de Flemming, ou seja, a partir de células simples do tecido conjuntivo, mas que Toldt também estava correto em sua afirmação de que a gordura era depositada em células especializadas ricas em citosol (figura 1.1). Além disso, ele também observou a formação de gordura em células ambulantes no plasma, chamadas assim por ele.



**Figura 1.1: Ilustração das observações de células ricas em citosol.** Amostra de tecido subpleural de espécime de feto humano no sétimo mês. Células demonstram glóbulos únicos de gordura. Imagem demonstrada por Shaw (1901).

Em 1883, Ehrmann (1883, *apud* SHAW, 1901) observou células poligonais granulares que ocasionalmente continham muitos glóbulos de gordura, revivendo o nome originalmente dado a estas células por Ludwig, as denominando de células ‘amoras’ (figura 1.2). Ehrmann se opõe a chamar estas células de glândulas e postula que provavelmente sejam células ambulantes, como descrito por Waldeyer. Aproximadamente trinta anos depois de suas primeiras observações, Kolliker (1886, *apud* SHAW, 1901) reafirmou suas descrições, dizendo que lóbulos gordurosos eram produzidos a partir de um tipo especial células do tecido conjuntivo. Ele também dizia que as células de gordura poderiam se reverter em células do tecido conjuntivo e estas novamente em células de gordura.



**Figura 1.2: Ilustração das observações de células com diversos glóbulos de gordura.** Amostra de tecido subpleural de espécime de feto humano no nono mês. Não foi observada nenhuma célula de gordura unilocular, sendo estas caracterizadas como células ‘amora’. Imagem demonstrada por Shaw (1901).

Nesta revisão feita por Shaw em 1901, apesar de descrever diversas hipóteses ao longo do século XIX sobre o desenvolvimento do tecido adiposo, ele conclui que as observações feitas por Kolliker e as propostas daqueles que aceitavam suas descrições não eram suficientemente convincentes, e que os mesmos deveriam aceitar as descrições de Flemming sobre não haver ‘glândulas de gordura’ especializadas, mas que toda gordura era depositada em células do tecido conjuntivo.

Seria bastante surpreendente para esses primeiros pesquisadores o consenso atual, onde é aceito que o tecido adiposo apresenta função glandular, agindo como um órgão endócrino que

pode controlar diversas funções sistêmicas através da secreção de moléculas com funções autócrinas e parácrinas, além das diversas outras funções descritas para o tecido adiposo na manutenção da fisiologia dos vertebrados.

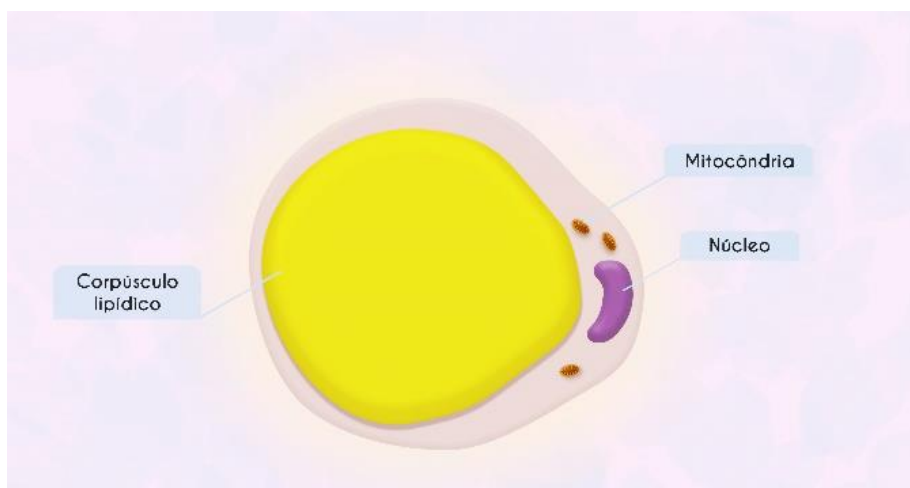
### **1.1.2 Descrição do tecido adiposo em mamíferos**

O tecido adiposo representa um tipo especial de tecido conjuntivo com a predominância de células gordurosas, os adipócitos, que representam em torno de 35 a 70% da massa desse tecido, que também possui outros tipos celulares encontrados em sua fração vascular estromal incluindo pré-adipócitos, células tronco mesenquimais, células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e demais células do sistema imune, dentre outras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RODRÍGUEZ A. *et al*, 2015).

Amplamente distribuído pelo corpo, o tecido adiposo representa em torno de 20 a 25% do peso corporal de mulheres e de 15 a 20% dos homens em pessoas de peso normal. Configura o maior depósito de energia do corpo, sob a forma de triacilglicerídeos (TAG) os quais são mais eficientes para produção de energia pois fornecem 9,3 kcal/g contra apenas 4,1 kcal/g fornecidas pela utilização do glicogênio como fonte energética.

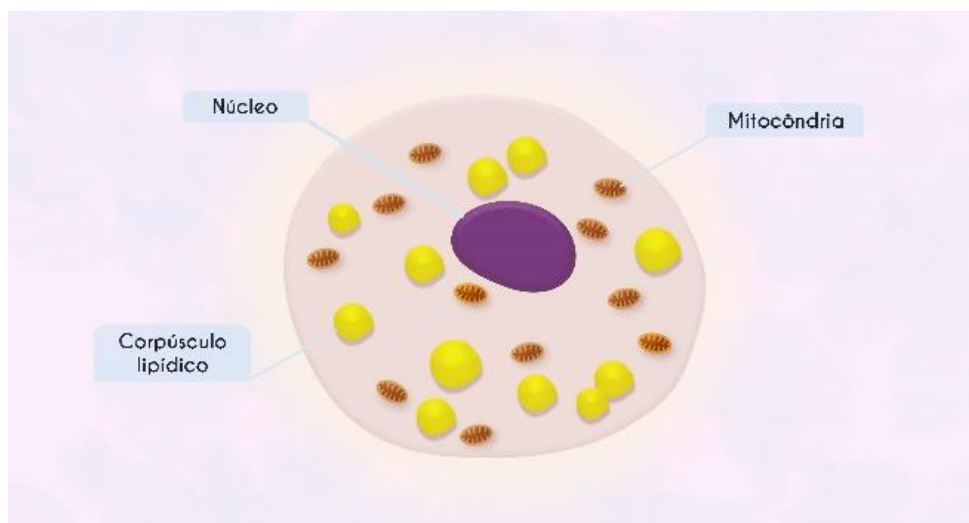
Os TAG do tecido adiposo não são depósitos estáveis, pois se renovam continuamente por influência de estímulos nervosos e hormonais. Além de seu papel energético, o tecido adiposo possui função estrutural, preenchendo os espaços entre outros tecidos, auxiliando no posicionamento dos órgãos. Forma também coxins absorventes de choques localizados principalmente na planta dos pés e palma das mãos e tem importante função de isolamento térmico ao organismo. Atualmente, tem sido também cada vez mais estudado seu papel na produção de moléculas importantes na fisiologia do organismo, confirmando sua atividade endócrina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; CHOI; COHEN, 2017).

Apesar de ser amplamente descrito em suas funções como um único tecido, o tecido adiposo pode se apresentar de duas formas principais, com diferenças entre sua distribuição, estrutura e papel fisiológico. Uma variedade é o tecido adiposo branco ou unilocular (WAT do inglês *White Adipose Tissue*), onde os adipócitos quando maduros contém uma grande gota/corpúsculo lipídico que ocupa quase todo o citoplasma (figura 1.3). O tecido adiposo branco será melhor detalhado adiante.



**Figura 1.3: Representação esquemática de adipócito branco.** O adipócito branco ou unilocular é uma célula de citoplasma grande com gota/corpúsculo lipídico que ocupa quase todo seu citoplasma, com suas organelas e núcleo achatados na periferia. Imagem: Shape - esquemas didáticos.

A outra variedade é o tecido adiposo marrom ou multilocular (*BAT* do inglês *Brown Adipose Tissue*), formado por adipócitos com numerosos corpúsculos lipídicos e muitas mitocôndrias (figura 1.4). Sua função principal e mais bem descrita é a produção de calor, sendo predominantemente responsável pela termorregulação dos organismos humanos recém-nascidos, além de estocar energia na forma de gordura e secretar adipocinas, porém em menor extensão que o tecido adiposo branco. Sua habilidade termogênica deriva da presença de proteínas desacopladoras 1 (UCP-1 ou termogenina), proteína mitocondrial que induz a produção de calor pelo desacoplamento da respiração na síntese de ATP (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; NEDERGAARD; CANNON, 2013).



**Figura 1.4: Representação esquemática de adipócito marrom.** O adipócito marrom se caracteriza por diversas gotículas/corpúsculos lipídicos e a presença de muitas mitocôndrias em seu citoplasma. Imagem: Shape – esquemas didáticos.

Recentes estudos revelaram a presença de células *brown-like* no tecido adiposo, chamadas bege ou ‘brite’ (do inglês brown-in-white). Os adipócitos bege são células que parecem ser originárias de células endoteliais ou perivasculares dentro do tecido adiposo branco, com uma assinatura genética única que é diferente das de adipócitos brancos ou marrons. Sob condições basais, adipócitos bege expressam baixos níveis de UCP-1, mas sob estímulo  $\beta$ -adrenérgico induzido por exposição ao frio ou exercícios, estes adipócitos produzem altas quantidades de UCP-1 e demonstram propriedades termogênicas (KHANDEKAR *et. al.*, 2012). Como os adipócitos bege ainda são uma categoria que precisa ser mais investigada, será um assunto somente mencionado neste trabalho.

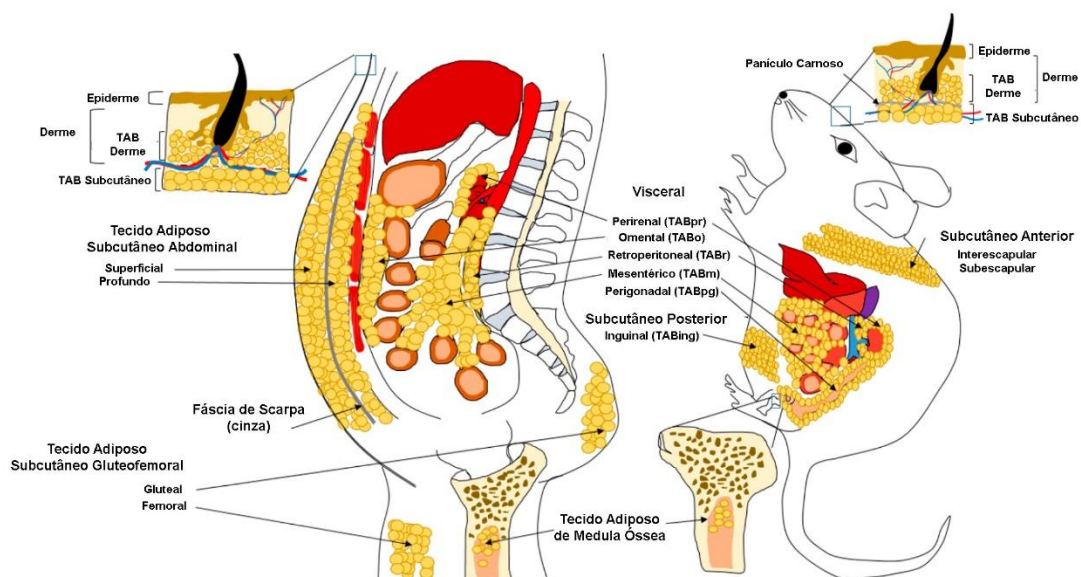
### 1.1.3 Caracterização do tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco, varia sua cor entre branco a amarelado dependendo da dieta. Esta coloração se deve principalmente ao acúmulo de carotenos (pigmentos orgânicos naturais presentes em certos alimentos) dissolvidos nos corpúsculos lipídicos. É o tipo de tecido adiposo predominantemente encontrado em humanos adultos tendo como principal função o acúmulo lipídico, sendo um local crítico para homeostase energética, com papel no metabolismo de glicose em resposta à insulina e ação endócrina (GESTA *et al.*, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

É composto majoritariamente por adipócitos uniloculares que são células grandes, medindo cerca de 50 a 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de forma esférica isoladamente, mas que assumem formas poliédricas no tecido pela compressão recíproca entre elas. Estas células demonstram

uma única e grande gotícula lipídica envolta por uma fina camada de citoplasma com núcleo achatado na periferia. Observações por microscopia eletrônica demonstram que, além do corpúsculo principal, existem outros muito menores, no entanto em cortes histológicos comuns os corpúsculos lipídicos são removidos pelo processamento com solventes orgânicos e cada célula se apresenta apenas contendo sua camada de citoplasma e núcleo. O tecido apresenta partes de tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos e nervos com a presença de fibras reticulares (colágeno III) que sustentam as células adiposas. A vascularização do tecido adiposo é muito abundante quando se considera a pequena quantidade de citoplasma funcional, onde a relação volume capilar sanguíneo/volume de citoplasma é maior que no músculo estriado por exemplo. Após a utilização das reservas energéticas, caso ocorram períodos de alimentação muito deficientes em calorias, ocorre primeiramente mobilização lipídica dos reservatórios subcutâneos seguido pelo do mesentério e retro peritoneais, enquanto que o tecido adiposo localizado nos coxins das mãos e dos pés resistem a longos períodos de desnutrição. Quando o tecido perde quase toda sua gordura, se transforma em um tecido com células de forma poligonais ou fusiformes, com raros corpúsculos lipídicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Anatomicamente, o tecido adiposo branco representa os dois maiores depósitos adiposos, o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo visceral ao redor dos órgãos internos. A organização e distribuição de alguns depósitos adiposos diferem no organismo humano comparado aos camundongos (figura 1.5) (GESTA et al., 2007; LUONG *et al.*, 2019).



**Figura 1.5: Depósitos de tecido adiposo branco.** Nos humanos, os depósitos adiposos de tecido adiposo branco são encontrados por todo corpo. Os depósitos de tecido adiposo branco (TAB) são principalmente o tecido adiposo visceral e o tecido adiposo subcutâneo. Os principais depósitos viscerais comuns em humanos e roedores incluem epicárdio / pericárdio (não mostrado), perirrenal (TABpr), retroperitoneal (TABr) e mesentérico (TABm). Embora

os humanos tenham grande gordura omental (TABo), camundongos têm grande gordura perigonadal (TABpg). O tecido adiposo subcutâneo em humanos pode ser dividido em superior (abdominal) e inferior (glúteo-femoral). A gordura abdominal em humanos pode ser dividida em superficial e profunda, que são separados anatomicamente pela fáscia de Scarpa, uma camada membranosa profunda no abdômem. Em camundongos, o tecido adiposo subcutâneo é dividido em anterior e posterior. O tecido adiposo branco dérmico (TABd) é outro depósito de gordura que existe em humanos e camundongos. O tecido adiposo da medula óssea é também outro depósito adiposo comum em ambas as espécies. Adaptado de LUONG *et al.* (2019).

O tecido adiposo subcutâneo é a camada de tecido que é a base da pele, sendo amplamente distribuído pelo corpo. Composto principalmente por adipócitos brancos, vale mencionar que o tecido adiposo subcutâneo possui constituição complexa, com a presença de inúmeros vasos sanguíneos e terminações nervosas, reforçando que suas funções vão muito além do suporte estrutural do corpo e armazenamento de gorduras, se estendendo também a funções neuroendócrinas (GUILHERME *et al.*, 2019).

O tecido adiposo branco tem sido cada vez mais descrito como um órgão secretor, sintetizando diversas moléculas com funções biológicas importantes na fisiologia do organismo – as adipocinas. Este tecido é o mais profundamente caracterizado, sendo o tipo mais referido quando se trata das propriedades secretoras do tecido adiposo.

A linhagem celular de fibroblastos 3T3-L1, isoladas e expandidas de camundongos *Swiss* por Green e Meuth (1974), é o modelo *in vitro* mais comum utilizado para o estudo da biologia dos adipócitos, por seu potencial de diferenciação e acúmulo lipídico, sendo um modelo crítico para o avanço dos estudos sobre adipogênese, metabolismo lipídico, ação hormonal e obesidade (RUIZ-OJEDA *et al.*, 2016).

#### **1.1.4 Metabolismo dos adipócitos**

Em termos quantitativos, o tecido adiposo branco é o maior órgão de reserva energética no corpo. Mais de 95% dos lipídeos do corpo são encontrados nas reservas de tecido adiposo na forma de triacilglicerídeos (TAG), com menor quantidade em outros tecidos como fígado e músculos. Menos de 0,1% dos lipídeos corporais estão no plasma (COPPACK *et. al.*, 1994). Como um órgão de armazenamento de energia, o tecido adiposo estoca triacilglicerol em estado alimentado e quebra esta reserva em condições de escassez nutricional providenciando combustível para outros órgãos na forma de glicerol e ácidos graxos livres, sendo altamente

regulado pela mudança desses estados nutricionais com sinalização hormonal (insulina e catecolaminas principalmente em humanos) e exercícios. A integridade dos processos que regulam o metabolismo dos adipócitos é essencial para manter a homeostase do peso corporal e a desregulação desses processos tem provavelmente importante papel em patologias como obesidade e diabetes tipo 2 (LARGE *et al.*, 2004).

Uma pequena parte de TAGs pode ser sintetizada nos adipócitos utilizando carboidratos, no processo de lipogênese, onde ocorre biossíntese *de novo* de ácidos graxos a partir de substratos não lipídicos. A maioria dos TAGs plasmáticos são provenientes da dieta lipídica, secretados do intestino na forma de quilomícrons ou do fígado em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), onde os ácidos graxos são capturados pelos adipócitos para integrar a síntese bioquímica da formação de TAG, que consiste na esterificação de uma molécula de glicerol-3-fosfato com três moléculas de ácidos graxos complexadas a acil-coenzima A (acetil-CoA). Quando há necessidade nutricional para utilização das reservas lipídicas, as moléculas de TAG estocadas nos adipócitos são hidrolisadas no processo de lipólise, o qual será detalhado adiante.

#### **1.1.4.1 Lipólise**

O TAG é estocado no citosol da célula em corpúsculos lipídicos, organelas consideradas dinâmicas que são críticas durante a lipólise nos adipócitos. Os TAGs são quebrados gradualmente a diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG) para formar três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol por cada TAG hidrolisado (figura 1.6). Os ácidos graxos liberados pelo tecido adiposo podem entrar na circulação ligados a proteínas carreadoras e serem utilizados por outros órgão através da  $\beta$ -oxidação e subsequente geração de ATP. Adicionalmente, ácidos graxos e glicerol liberados também servem de substrato no fígado para a cetogênese e gliconeogênese, respectivamente. A lipólise requer a ação de lipases solúveis no citosol que precisam ter acesso ao substrato TAG que é altamente hidrofóbico e coberto por proteínas ao redor do corpúsculo lipídico (LAFONTAN, MAX; LANGIN, 2009).

Até o início dos anos 2000, a maioria das pesquisas sobre a lipólise focavam na lipase hormônio sensível (HSL), uma proteína citoplasmática de 84 kDa, a qual se acreditava que catalisava os dois primeiros passos da hidrólise de TAG. No entanto, em estudos com

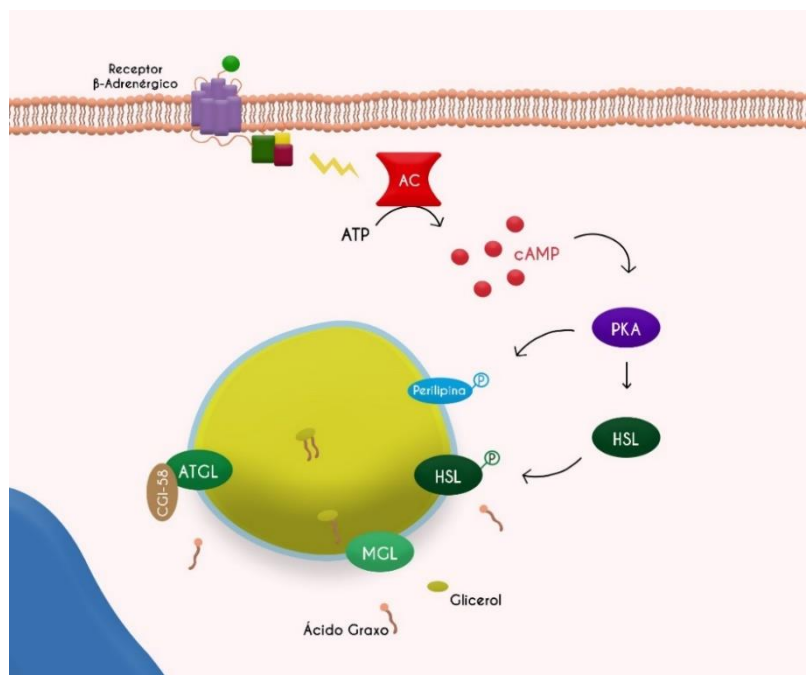


camundongos *knockout* para HSL foi observado que eles acumulavam DAG em numerosos tecidos, sugerindo que a enzima hidrolisa mais DAG que o TAG, e que uma adicional hidrolase de TAG pudesse existir (HAEMMERLE *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2004). Em 2004, três laboratórios independentes identificaram a mesma nova TAG lipase, nomeada desnutrina, fosfolipase A2 e lipase de triglicérido de tecido adiposo (ATGL), conduzindo a reavaliação do modelo clássico de lipólise (JENKINS *et al.*, 2004; VILLENA *et al.*, 2004; ZIMMERMANN *et al.*, 2004).

A lipase de triacilglicéridos do adipócito (ATGL) humana é uma proteína de 486 aminoácidos com peso molecular de 54 kDa, predominantemente expressa no tecido adiposo, participando da primeira etapa de hidrólise do TAG formando uma molécula de DAG assim como um ácido graxo livre. A ATGL demonstra a mais alta reatividade ao TAG como substrato, mas também pode hidrolisar DAG, embora com menor atividade (ZIMMERMANN *et al.*, 2004).

A HSL, formada por 775 aminoácidos com massa de 84 kDa, foi originalmente nomeada por sua ativação em resposta a sinais hormonais como de norepinefrina e epinefrina (VAUGHAN; STEINBERG, 1963). As primeiras investigações sobre essa enzima concluíam que a HSL catalisava a hidrólise de TAG e DAG pois apresenta ampla especificidade a substratos como tri-, di- e monoacilglicerol assim como colesterol e ésteres de retinol (YEAMAN, 2004). No entanto, suas taxas de hidrólise de DAG são significativamente mais altas para os outros substratos, sendo reconhecida por catalisar a segunda etapa da hidrólise de TAG, a quebra da molécula de DAG a MAG, liberando mais um ácido graxo.

A enzima da terceira etapa do catabolismo de TAG, monoacilglicerol lipase (MGL), é composta por 303 aminoácidos, tem peso molecular de 33 kDa e foi descoberta logo após a HSL (VAUGHAN *et al.*, 1964). É uma proteína que existe em abundância no citosol celular e não é regulada por hormônios para catalisar a etapa final da quebra de TAG, hidrolisando a molécula de MAG a glicerol e o último ácido graxo livre. Diferente de muitas lipases que possui ampla especificidade por outros substratos, a MGL não hidrolisa outros glicerolípídeos, como DAG, e o TAG, tão pouco ésteres de colesterol ou ésteres de retinol (COLEMAN; MASHEK, 2011).



**Figura 1.6: Representação esquemática do processo de lipólise.** A partir do estímulo de ativação do receptor  $\beta$ -adrenérgico, proteínas G estimulam a ativação da enzima adenilato ciclase (AC) que aumenta os níveis de AMP cíclico (cAMP) no citoplasma celular. A disponibilidade de cAMP leva à ativação da proteína quinase A (PKA) que por sua vez leva à fosforilação da enzima lipase hormônio sensível (HSL) e das proteínas perilipinas presentes na periferia dos corpúsculos. A lipase de triacilglicerídeos do adipócito (ATGL), associada ao seu ativador gene de identificação comparativa-58 (CGI-58), participa da primeira etapa de catabolismo do triglicerídeo, seguido da ação da HSL e da lipase de monoacilglicerol (MGL) para liberação de ácidos graxos livres e glicerol no processo de lipólise. Imagem: Shape – esquemas didáticos.

### 1.1.4.2 Regulação da lipólise

A lipólise é altamente regulada, com sinalizações que envolvem a produção e ativação de diversas proteínas citosólicas, assim como de proteínas que recobrem o corpúsculo lipídico. Diferentes fatores podem estimular a lipólise nas células, no entanto a ação das catecolaminas,

adrenalina e noradrenalina, representam os reguladores mais sofisticados das funções celulares nos adipócitos, estimulando a lipólise pela interação com receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo esta a via melhor detalhada a seguir (LAFONTAN; BERLAN, 1993).

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos se encontram na membrana plasmática acoplados ao complexo de proteínas G estimulatórias (Gs), responsável pela ativação de adenilato ciclase (AC), que leva ao aumento da concentração de AMP cíclico (cAMP) intracelular que por sua vez promove a ativação da proteína quinase A dependente de cAMP (PKA). A PKA fosforila a HSL citoplasmática, induzindo seu deslocamento para a periferia do corpúsculo lipídico onde interage com as proteínas perilipinas também fosforiladas por PKA, ocorrendo então mudanças conformacionais no corpúsculo que facilitam a ação das lipases na degradação da reserva de TAG. As perilipinas pertencem a uma família de diversas proteínas que recobrem corpúsculos lipídicos, sendo caracterizadas pela presença de regiões N-terminal conservadas definidas como domínios PAT, sendo nomeadas por perilipina, adipofilina (proteína relacionada à diferenciação de adipócitos - ADRP), e TIP47. No entanto estas proteínas PAT são expressas em diferentes tecidos, sugerindo potenciais funções tecido específicas. Nos adipócitos maduros, a perilipina mais bem descrita como reguladora do estímulo lipolítico é a perilipina 1 (PLIN1, Perilipina A) (GREENBERG *et al.*, 1993).

As propriedades de ativação da lipólise também dependem de proteínas que não estão diretamente envolvidas no processo catalítico. Uma proteína bem descrita interagindo com a HSL nesse processo é a FABP4. A FABP4 é uma proteína citosólica de ligação a ácidos graxos, expressa nos adipócitos, envolvida no tráfico de ácidos graxos e ácido retinoico intracelular. Porém, adicionalmente, a HSL contém um sítio de ligação que permite sua associação à FABP4. Quando a HSL é fosforilada por PKA, a FABP4 se liga a ela formando um complexo que se desloca para os corpúsculos lipídicos, direcionando a enzima para seu local de ação (SMITH *et al.*, 2007).

Simultaneamente, a atividade enzimática de ATGL também parece requerer interação com proteínas do corpúsculo lipídico, no entanto estas interações ainda não foram profundamente caracterizadas. A proteína de interação à ATGL mais bem estudada é o gene de identificação comparativa-58 (CGI-58 ou ABHD5). Com função descrita por Lass e colaboradores em 2006 (LASS *et al.*, 2006), ela é responsável pelo aumento da atividade enzimática de ATGL em 20 vezes. Esta proteína se encontra ligada à perilipina na superfície

dos corpúsculos, mas após estímulo da lipólise, o CGI-58 se dissocia da perilipina e se liga ao ATGL. Foi demonstrado que a interação entre ATGL e CGI-58 ocorre principalmente com ATGL associada ao corpúsculo e, em menor grau, no citoplasma (GRANNEMAN *et al.*, 2009). Apesar da PKA estimular uma série de eventos após a fosforilação da perilipina, a ATGL parece não ser fosforilada por ela, ocorrendo então a fosforilação de perilipina por PKA, permitindo a dissociação das perilipinas de CGI-58, que estimula a ação de ATGL (MIYOSHI *et al.*, 2008).

Alguns hormônios são conhecidos por participar da regulação da lipólise. Entre todos os fatores endócrinos, a insulina é quantitativa e qualitativamente o mais relevante. O impacto do hormônio do crescimento, hormônio adrenocorticotrópico, cortisol, hormônios da tireoide, hormônio da paratireoide e glucagon são comparativamente muito mais reduzidos que da insulina. A insulina é um regulador chave na biologia do tecido adiposo que controla não só a lipogênese mas também as taxas de lipólise e efluxo de ácidos graxos.

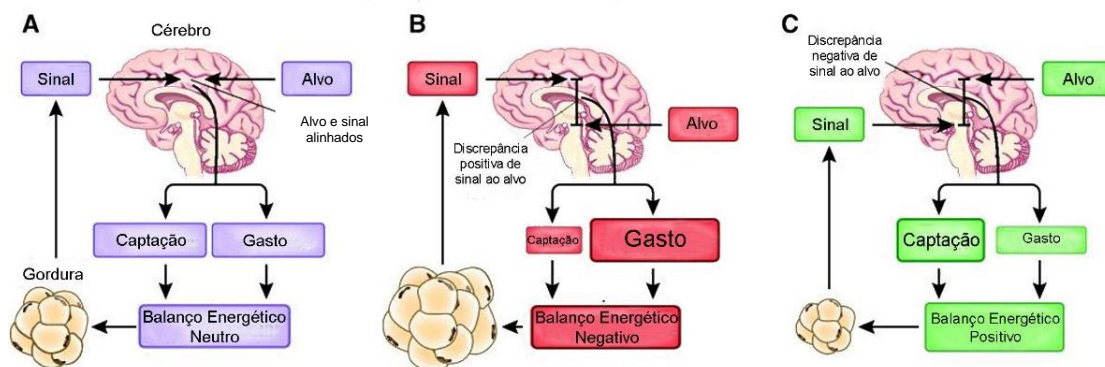
Durante o estado alimentado, a insulina se liga ao seu receptor específico na superfície dos adipócitos induzindo sua fosforilação que leva à interação com os substratos do receptor de insulina (IRS), que por sua vez ativam o complexo fosfatidilinositol quinase (PI3K). A inibição da lipólise basal e induzida por catecolaminas é promovida pela fosforilação e ativação de fosfodiesterase 3B (PDE3B), que catalisa a quebra de cAMP para sua forma inativa, diminuindo sua concentração e assim inibindo os eventos da lipólise. Entre os reguladores clássicos da lipólise, a estimulação adrenérgica e o controle da mobilização lipídica mediado pela insulina são os mais conhecidos (FRÜHBECK *et al.*, 2014).

Outros reconhecidos mediadores da lipólise incluem a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (GAUDIOT *et al.*, 1998), peptídeo natriurético atrial secretado por células musculares cardíacas atriais (LAFONTAN, MAX *et al.*, 2008), além da participação da proteína ativada por AMP quinase (AMPK), proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e mediadores produzidos pelo próprio tecido adiposo como as adipocinas (COLEMAN; MASHEK, 2011; FRÜHBECK *et al.*, 2014). Com isso, a lipólise precisa ser reanalisada a partir de uma perspectiva mais ampla de suas necessidades fisiológicas específicas ou contexto patológico, uma vez que as taxas lipolíticas basais ou estimuladas podem ocorrer sob diversas condições e por diferentes mecanismos.

### 1.1.5 Função endócrina do tecido adiposo

Com os avanços oriundos das investigações sobre o tecido adiposo nos últimos anos tem se tornado claro seu papel em funções endócrinas no organismo a partir da secreção de proteínas que desencadeiam sinais regulatórios para todo corpo, as chamadas adipocinas. O controle do comportamento alimentar, a sensibilidade periférica à insulina e até o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino estão entre os eventos fisiológicos controlados por estas biomoléculas (GIRALT *et al.*, 2015). O tecido adiposo branco produz seu próprio padrão de proteínas regulatórias que ainda tem sido investigado. Portanto, no que diz respeito ao papel endócrino das adipocinas, o maior enfoque é dado àquelas produzidas pelo tecido adiposo branco, pois são as mais compreendidas até então.

Na década de 50, Kennedy postulou a existência de um fator ‘lipoestático’ circulante que exercia funções capazes de agir a nível central no controle de gasto energético e captação de nutrientes (KENNEDY, 1953) (figura 1.7). Ele sugeriu que a gordura poderia produzir um sinal que era captado pelo cérebro, sendo relacionado com os níveis de gordura corporal, onde qualquer mudança entre o alvo e o sinal desencadearia em alterações na captação ou gasto de gordura. Baseado no simples conceito de um sistema com *feedback* negativo em torno de um alvo definido, foi nomeado um modelo lipoestático de regulação da gordura corporal. Mais de 40 anos depois, a leptina foi descoberta (ZHANG, Y *et al.*, 1994), sendo descrita como um hormônio produzido por adipócitos que interage com receptores no cérebro em áreas conhecidas por estarem ligadas a regulação do balanço energético no hipotálamo (MERCER *et al.*, 1996), levando assim a novos paradigmas sobre o papel do tecido adiposo como um órgão endócrino capaz de controlar ativamente a homeostase energética.



**Figura 1.7: Modelo lipoestático de regulação da gordura corporal.** Este modelo foi sugerido pela primeira vez por Kennedy (1953) e amplamente adotado na década de 1990 após a descoberta da leptina. Nesse modelo, o tecido adiposo produz um sinal (geralmente presume-se envolver a leptina) que é passado ao cérebro, onde é

comparado com um alvo (o ponto de ajuste do sistema) (A). Discrepâncias entre o nível do sinal e o alvo são traduzidas em efeitos sobre o gasto e a ingestão de energia para equalizar a discrepância e manter a homeostase. Ou seja, se o sinal for muito alto (como em B, onde a gordura corporal está acima do nível do alvo), o gasto é aumentado e a ingestão diminuída até que a gordura caia e o sinal e o alvo voltem a ficar alinhados. Por outro lado, se o sinal for baixo em relação ao alvo (como em C, onde o indivíduo é muito magro conforme determinado pelo ponto de ajuste), a ingestão é aumentada e o gasto é reduzido para levar a um balanço energético positivo, resultando em um aumento da gordura e trazendo o alvo e o sinal de volta ao alinhamento. Adaptado de Speakman *et al.* (2011).

É importante citar que o uso do termo ‘adipocina’ pode se referir a fatores produzidos especificamente pelos adipócitos, ou se aplicar de maneira mais geral a fatores produzidos por qualquer tipo celular presente no tecido adiposo. A literatura existente tende a usar o termo sem distinguir este ponto, mas é preciso entender que no papel endócrino do tecido adiposo algumas das conhecidas adipocinas são expressas principalmente pelos adipócitos, como adiponectina e leptina, porém algumas moléculas, como citocinas e quimiocinas, podem ser igualmente secretadas pelas demais células do parênquima do tecido adiposo, tais como as células imunes, vasculares e pré-adipócitos. Uma breve descrição sobre as principais adipocinas será apresentada a seguir.

### 1.1.5.1 Leptina

A leptina foi identificada como o produto do gene associado a obesidade em estudos com camundongos homocigotos para o alelo recessivo *ob* (ZHANG, Y *et al.*, 1994). É um hormônio peptídico com estrutura helicoidal similar à de citocinas como as interleucinas (LORD *et al.*, 1998). É uma proteína de 16 kDa produzida principalmente pelos adipócitos, especialmente do tecido adiposo subcutâneo, e, em menor extensão, por outros tecidos como epitélio gástrico e cérebro, sendo produzida de forma proporcional à massa de gordura corporal (HARWOOD, 2012). A leptina age principalmente no hipotálamo, sinalizando o sistema nervoso sobre o status nutricional dos adipócitos, controlando a captação de nutrientes com um sinal de saciedade (AHIMA *et al.*, 1996).

Em resposta à sinalização mediada pela leptina o cérebro comanda tecidos periféricos a aumentarem a oxidação de ácidos graxos, reduzir a glicose plasmática e induzir a termogênese, reduzindo então a massa adiposa. Além disso, no estado em jejum, os níveis de leptina baixam

junto com os de insulina, estimulando assim o apetite, inibindo a atividade lipolítica e termogênica e suprimindo a ação de hormônios anabólicos (CHAN *et al.*, 2003).

As ações da leptina não estão limitadas ao controle do apetite pelo sistema nervoso central. Outros estudos mostram que a leptina também tem importante papel na regulação de funções de órgãos periféricos como os órgãos reprodutores femininos (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2015). Muitos tecidos periféricos expressam algumas formas de receptores de leptina e, portanto, respondem ao estímulo catabólico da proteína. A leptina age nas células- $\beta$  pancreáticas modulando a homeostase de glicose produzindo efeitos na expressão e secreção de insulina (MARROQUÍ *et al.*, 2012). Adicionalmente, a leptina pode regular a resposta imune com efeito inflamatório capaz de estimular células de resposta inata e adaptativa, aparentemente exercendo papel pró-inflamatório (NAYLOR; PETRI, 2016).

### 1.1.5.2 Adiponectina

A adiponectina, também conhecida como AdipoQ ou ACRP30, é uma proteína hormonal de 30 kDa originária do tecido adiposo. Entre as adipocinas atualmente conhecidas, a adiponectina está presente em altas concentrações no plasma, em torno de 10-30  $\mu\text{g/mL}$ , o que representa 0.01% das proteínas plasmáticas, níveis notavelmente maiores que outros hormônios como a insulina e leptina por exemplo. Pode se apresentar de três formas: um trímero de baixo peso molecular de aproximadamente 67 kDa, um hexâmetro de aproximadamente 120 kDa e um multímero de alto peso molecular de mais de 300 kDa, sendo esta forma de maior potência e atividade biológica. Embora seja sintetizada quase exclusivamente pelos adipócitos, ela também é expressa em células musculares esqueléticas, miócitos cardíacos e células endoteliais (SCHERER *et al.*, 1995; WHITEHEAD *et al.*, 2006).

O principal efeito da adiponectina na sensibilidade à insulina foi descoberto simultaneamente por três grupos independentes em 2001 (BERG *et al.*, 2001; FRUEBIS *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2001). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina pela interação com seus receptores de membrana, AdipoR1 e AdipoR2, em parte promovendo a ação de AMPK. Essa quinase é um importante regulador metabólico que age como um sensor do status nutricional e pode ativar a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, assim como inibir a gliconeogênese hepática e a lipólise em adipócitos. Foi demonstrado que a adiponectina

ativa AMPK e reduz a expressão de enzimas gliconeogênicas como fosfoenolpiruvato carboxilase e glicose-6-fosfato, levando então à supressão da via (KADOWAKI *et al.*, 2006; NAWROCKI *et al.*, 2006; PAJVANI *et al.*, 2003). No músculo esquelético, a adiponectina também ativa o coativador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ), promovendo biogênese mitocondrial e metabolismo oxidativo (IWABU *et al.*, 2010).

Além da sensibilidade à insulina, outro papel funcional desta proteína é regular a termogênese e homeostase energética, no entanto permanece controverso se ela promove ou suprime esse processo (HUI *et al.*, 2015). A função fisiológica e seus mecanismos na regulação do gasto de energia precisam ser melhor investigados. A adiponectina também induz efeitos na modulação inflamatória, parecendo agir como uma molécula anti-inflamatória (ROBINSON *et al.*, 2011). As ações de adiponectina nos adipócitos multiloculares não são claras, com alguns relatos indicando que a adiponectina promove termogênese (WEI *et al.*, 2017) e outros reportando que a adiponectina atenua o recrutamento do tecido adiposo multilocular pela diminuição da expressão e ativação do receptor  $\beta$ -adrenérgico (QIAO *et al.*, 2014).

Em contraste com a leptina, os níveis de adiponectina não são aumentados em indivíduos obesos com diabetes tipo 2, mostrando-se baixos em indivíduos obesos em geral e se correlacionando negativamente com a adiposidade. A adiponectina é uma das poucas adipocinas que correlacionam negativamente com a resistência à insulina. Sua produção é aumentada sob condições de magreza e é inibida por moléculas pró-inflamatórias, que são conhecidas por prejudicarem o status metabólico de pacientes obesos (LI *et al.*, 2009). A adiponectina também induz efeitos na modulação inflamatória, com características anti-inflamatórias, exercidos através de mecanismos que envolvem a supressão da transformação do macrófago ao perfil 'espumoso' (OUCHI *et al.*, 2001) e indução dos macrófagos a produzirem a proteína anti-inflamatória IL-10 (KUMADA *et al.*, 2004). Além disso a adiponectina também atua sobre a via de NF-kB, podendo ter efeitos estimulatórios ou inibitórios (AJUWON; SPURLOCK, 2005; TANG *et al.*, 2007), além de interagir com o TNF reduzindo seu efeito inflamatório, com a observação de níveis de TNF em correlação inversa aos de adiponectina no plasma humano (KERN *et al.*, 2003; ROBINSON, KATHERINE; PRINS; VENKATESH, 2011).



### 1.1.5.3 Outras adipocinas

Em adição as adipocinas mencionadas anteriormente, o tecido adiposo é capaz de produzir uma variedade de outros sinais moleculares (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1: Outras adipocinas produzidas pelo tecido adiposo**

<b>Adipsina</b>	Produzida principalmente pelos macrófagos residentes assim como pelos adipócitos, é uma proteína que ativa a via alternativa do complemento e estimula o acúmulo de triacilglicerídeos nos adipócitos (COOK et al., 1987). Foi recentemente demonstrado seu envolvimento na manutenção da função de células $\beta$ -pancreáticas (LO et al., 2014).
<b>Apelina</b>	Produzida pelos adipócitos e outras células estaminais estromais, foi proposta como tendo papel na regulação da homeostase de glicose. Níveis circulantes de apelina foram encontrados aumentados em pacientes obesos e resistentes à insulina (CASTAN-LAURELL et al., 2011).
<b>Omentina</b>	Produzida por células não-adiposas em depósitos adiposos, é principalmente encontrada no tecido adiposo visceral (YANG, RONG-ZE et al., 2006). Níveis plasmáticos de omentina estão reduzidos na obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2. A omentina tem efeito insulino-sensibilizante e foi reportada com propriedades anti-inflamatórias, anti-aterogênicas e anti doença cardiovascular (TAN et al., 2010).
<b>RBP4 (proteína de ligação ao retinol 4)</b>	Secretada pelos adipócitos, sua ação primária é como transportadora de retinol, no entanto, propriedades de sinalização não relacionadas ao transporte da vitamina A foram reportadas, principalmente a indução da produção de glicose hepática e resistência à insulina (YANG et al., 2005). Seus níveis estão aumentados na obesidade (OUCHI et al., 2011).
<b>Resistina</b>	A resistina, também conhecida como FIZZ3, é um peptídeo originalmente encontrado sendo secretado em adipócitos de camundongos (SAVAGE et al., 2001). No entanto, em humanos, a resistina é principalmente produzida pelos macrófagos e monócitos

	(PATEL <i>et al.</i> , 2003). Há debates sobre o papel funcional da resistina em camundongos e humanos, mas a predição é de que participa promovendo resistência à insulina em humanos da mesma forma como em camundongos (HARWOOD, 2012). A resistina se apresenta com características pró-inflamatórias (PARK; AHIMA, 2013), no entanto suas funções fisiológicas ainda precisam ser melhor investigadas.
<b>Vaspina (serpina derivada de tecido adiposo visceral)</b>	Predominantemente secretada pela gordura visceral, é um inibidor serino-protease que reduz os níveis de leptina, resistina e citocinas pró-inflamatórias, melhorando assim a sensibilidade à insulina (HIDA <i>et al.</i> , 2005). Seus níveis estão aumentados em pacientes obesos (YOUN <i>et al.</i> , 2008).
<b>Visfatina</b>	Produzida por adipócitos e linfócitos, é principalmente produzida nos depósitos adiposos viscerais. Também conhecida como citocina PBEF (fator de melhoramento de colônia de pré-célula B), é uma forma extracelular da enzima Nampt (nicotinamida fosforibosil transferase), uma enzima essencial na via biossintética de NAD a partir da nicotinamida. Foi proposta agindo como um insulino-mimético capaz de aumentar a captação de glicose e melhorando a resistência à insulina (FUKUHARA <i>et al.</i> , 2005).

Em adição a essas moléculas, existem outros fatores hormonais que são principalmente produzidos por tecidos e tipos celulares diferentes do tecido adiposo e adipócitos, mas também vem sendo descritos com funções a partir do tecido adiposo. Entre estes fatores estão o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento de nervo (NGF) e fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21). Além das adipocinas convencionais, o tecido secreta um vasto número de moléculas pró-inflamatórias e quimiocinas que estão geralmente envolvidas na resistência à insulina associada com a obesidade ou a lipodistrofia pela indução de inflamação local no tecido adiposo, além das

citocinas que podem ser secretadas por células imunes infiltradas, como macrófagos e linfócitos (GIRALT *et al.*, 2015).

#### **1.1.5.4 Ácidos graxos livres: moléculas sinalizadoras não proteicas produzidas pelo tecido adiposo branco**

Antes do papel endócrino do tecido adiposo ter sido caracterizado, os adipócitos brancos eram conhecidos como fonte de ácidos graxos não esterificados oriundos da ativação da lipólise. Em adição ao seu papel como reservatório energético, os ácidos graxos livres foram caracterizados como moléculas de função sinalizadora, capazes de influenciar a sinalização intracelular em múltiplos tipos celulares assim como moduladores de transcrição gênica em células e órgãos alvo.

Efeitos deletérios no metabolismo são primariamente atribuídos aos ácidos graxos saturados, que não possuem ligações duplas como por exemplo o ácido palmítico (16:0), em detrimento dos insaturados, que por sua vez apresentam uma ou mais duplas ligações, como por exemplo ácido oleico (18:1), estando ambos presentes na forma de triacilglicerídeos no tecido adiposo e, portanto, sendo capazes de serem liberados na circulação durante a lipólise no tecido. Recentes estudos com roedores demonstraram que o ácido palmitoleico (16:1) derivado do tecido adiposo pode servir como uma “lipocina” que contribui para a resistência à obesidade induzida por dieta. Ainda precisa ser descrito se o ácido palmitoleico se comporta como uma lipocina que reduz a ocorrência de obesidade em humanos (CAO *et al.*, 2008; STRYJECKI; MUTCH, 2011). Adicionalmente, ácidos graxos insaturados também podem modular a secreção e função de outras adipocinas, como por exemplo no estímulo da produção de adiponectina (FLACHS *et al.*, 2006).

### **1.1.6 O tecido adiposo como órgão imunológico**

O tecido adiposo contém grande diversidade de células imunes que o faz um órgão endócrino capaz de integrar metabolismo e imunidade. A digestão enzimática do tecido adiposo é uma técnica usada para separar células adiposas de células do estroma, que consiste em células imunes, pré-adipócitos, células endoteliais, entre outras. Nesta fração de células estromais, numerosas células imunológicas incluindo células B, células T, macrófagos e neutrófilos foram

identificadas no tecido adiposo. Os leucócitos representam aproximadamente dois terços desta fração, que contém aproximadamente 2-5 milhões de células/g de tecido (GRANT *et al.*, 2013). As observações acerca das características imunológicas no tecido adiposo foram melhor descritas até então em modelos de estudos sobre a obesidade e suas comorbidades associadas (GRANT; DIXIT, 2015).

O entendimento sobre leucócitos residentes do tecido adiposo começou com a identificação da subpopulação de macrófagos no tecido. Descrições feitas por Weisberg e colaboradores e Xu e colaboradores demonstraram que a presença de macrófagos é aumentada no tecido adiposo durante a obesidade e que estas células são a fonte primária de produção de citocinas pró-inflamatórias (WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003). Antes da consideração do tecido adiposo como órgão imunológico e obesidade como um estado inflamatório, o desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade era descrito como resultado da hipertrofia de adipócitos e do aumento de adipocinas pró-inflamatórias.

A infiltração de células imunológicas não era reconhecida como um agravante neste processo. No entanto, após as descrições feitas por Weisberg e colaboradores, a infiltração e acúmulo de macrófagos no tecido adiposo foi associada ao aumento da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6, contribuindo para a resistência à insulina (WEISBERG *et al.*, 2003). Estudos subsequentes destacaram a complexidade dos mecanismos envolvidos, demonstrando que a obesidade resulta no recrutamento de macrófagos relacionados ao polo M1 (macrófagos de perfil pró-inflamatório) circulantes e a troca de polarização de macrófagos residentes M2 (fenotipicamente imunorreguladores, anti-inflamatório) para M1 (FUJISAKA *et al.*, 2009; LUMENG *et al.*, 2007). Os efeitos locais desta troca de subpopulações M2 para M1 de macrófagos durante a obesidade leva não só à inflamação do tecido adiposo, mas influencia também na capacidade dos adipócitos de estocarem lipídeos, na sua sensibilidade à insulina, no metabolismo sistêmico de glicose e, por fim, em toda a homeostase metabólica.

Todos os tipos de células imunológicas foram encontrados no tecido adiposo, embora as subpopulações de leucócitos pareçam variar de um sítio anatômico ao outro. Em adição aos macrófagos, outras células imunológicas foram identificadas incluindo células dendríticas (BERTOLA *et al.*, 2012), células B (WINER *et al.*, 2011), células T (NISHIMURA *et al.*, 2009), células NK (BOULENOUAR *et al.*, 2017), neutrófilos (ELGAZAR-CARMON *et al.*, 2008; TALUKDAR *et al.*, 2012), eosinófilos (WU *et al.*, 2011) e mastócitos (LIU *et al.*, 2009).

Além disso, não está claro se o compartimento imune do tecido adiposo muda transitoriamente em resposta aos sinais metabólicos durante o ciclo fisiológico entre o estado alimentado ou de fome. O surgimento de novos dados sobre as interações entre células metabólicas e imunológicas levou a um novo campo de pesquisa, o imunometabolismo, que se refere à interação entre os processos imunológicos e as vias metabólicas, tendo o tecido adiposo como o protótipo de estudo onde células imunes e metabólicas interagem e se auto regulam (MATHIS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2018).

Os macrófagos do tecido adiposo levam à imunidade inata e adaptativa através da secreção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos DAMPs (padrões moleculares associados a danos) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), mas também sendo os apresentadores de antígenos primários no tecido adiposo induzindo a proliferação de células T (MORRIS *et al.*, 2013). Em adição aos macrófagos, células B (WINER *et al.*, 2011) e adipócitos (DENG *et al.*, 2013) também foram descritos participando da resposta imune, apresentando antígenos. No entanto a contribuição dessas populações celulares e maior descrição da apresentação de antígenos durante a obesidade necessita de maiores estudos.

O tecido adiposo possui diversas características de um órgão imunológico (GRANT, *et al.*, 2015; STOLARCZYK, 2017). Os subtipos de leucócitos no tecido adiposo demonstram ter papel importante na restauração da homeostase assim como na patogênese de diversas doenças crônicas associadas à obesidade oriunda da inflamação, que permanece com muitos questionamentos sobre seu desenvolvimento. A contribuição das células imunes no tecido adiposo e seu papel modulador têm sido bastante revisados (NISHIMURA *et al.*, 2009; SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH, 2010; GUZIK *et al.*, 2017). Porém, ainda não está claro se o tecido adiposo participa da função imunológica clássica de defesa do hospedeiro contra patógenos. Estudos que relacionam a contribuição do tecido adiposo em doenças infecciosas serão discutidos no tópico a seguir.

### **1.1.7 Tecido adiposo e doenças infecciosas**

Historicamente, a resposta pró-inflamatória no tecido adiposo, capaz de exercer efeitos locais e parácrinos, sugeria que o mesmo contribuía para a resposta imune inata contra infecções, provavelmente devido ao grande número de macrófagos residentes. Com isso, o potencial imunológico do tecido adiposo tem sido revisado, construindo-se o entendimento que,

apesar do tecido adiposo branco contribuir para a resposta imune contra infecções, ele também pode ser subvertido a alvo e refúgio para determinados patógenos.

Comumente nas pesquisas sobre o tecido adiposo, os dados iniciais emergem de estudos sobre a correlação entre obesidade e susceptibilidade a infecções, com o tecido adiposo tendo papel chave na relação entre metabolismo e sistema imune. Uma infecção pode impactar na biologia do tecido adiposo indiretamente por consequência da inflamação, e/ou diretamente, pelo impacto da persistência do patógeno localmente.

O conhecimento sobre o potencial do tecido adiposo no controle de infecções também se beneficiou por pesquisas mostrando que os adipócitos por si só exercem respostas antimicrobianas com indução adipogênica e produção do peptídeo antimicrobiano catelicidina contra o patógeno *Staphylococcus aureus* (ZHANG, *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019). Adicionalmente, a descoberta do acúmulo de células T de memória no tecido adiposo como um meio de fornecer respostas secundárias eficientes contra patógenos tornou claro que o tecido adiposo pode funcionar como um parceiro imunológico em respostas imunes locais e sistêmicas (HAN, SEONG JI *et al.*, 2017).

Vale mencionar que a proximidade entre o tecido adiposo a sítios de ação imunológica no corpo como a medula óssea (SCHELLER *et al.*, 2016), linfonodos (KNIGHT, 2008) e o timo (COÍN ARAGÜEZ *et al.*, 2013) aumenta a importância sobre sua contribuição significativamente para a resposta imune local após a primeira barreira física ter sido violada.

As evidências sugerem que o tecido adiposo pode agir passivamente ou ativamente como uma segunda linha de defesa contra invasões microbianas, tendo em vista que os depósitos adiposos diferem em sua composição de células imunes, eles também podem diferir em sua contribuição na ação imunológica (BOURGEOIS *et al.*, 2019).

A coexistência de células imunológicas e patógenos no do tecido adiposo emerge como um interessante foco para estudos de características de diversas patologias. Dessa forma seu impacto na resposta imune contra infecções requer maiores investigações. A seguir serão apresentados trabalhos que descrevem o tecido adiposo como alvo de diversos agentes incluindo protozoários, vírus e bactérias, assim como suas respectivas implicações para a patogênese das doenças mencionadas.

### 1.1.7.1 Protozoários: *Trypanossoma spp*, *Plasmodium spp*

No geral, os microrganismos demonstram grande diversidade a respeito do ambiente que colonizam ou invadem. Dentre os que infectam mamíferos, há os que vivem dentro das células hospedeiras enquanto outros vivem nos espaços extracelulares. Alguns se mantêm no sangue, enquanto outros podem penetrar e se acumularem em tecidos, onde podem persistir nestes reservatórios, evadindo-se da resposta imune do hospedeiro.

A localização dos microrganismos tem implicações no tipo e eficiência da resposta imune e conseqüentemente na patologia e tratamento da doença, seu potencial de transmissão e sobrevivência do hospedeiro. Apesar do tecido adiposo já ter sido considerado um tecido inerte especializado somente em reserva energética na forma de lipídeos, nos últimos anos tem sido reconhecido como um órgão com diversas funções que podem contribuir no entendimento da patofisiologia das doenças infecciosas.

Diferentes microrganismos têm sido descritos como potencialmente infectivos para o tecido adiposo, sendo o *Trypanossoma cruzi* o melhor exemplo até o momento. O *T. cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, uma importante causa de morbidades e mortalidades em áreas endêmicas do México, Américas Central e Sul (TANOWITZ, *et al.*, 1992). Há décadas atrás já ocorrem relatos da ocorrência de *T. cruzi* sendo encontrado em tecido adiposo. Em modelo murino, o parasito foi reportado presente no tecido adiposo multilocular (SHOEMAKER *et al.*, 1970) e Andrade e Silva publicaram micrografias eletrônicas de amastigotas de *T. cruzi* dentro de adipócitos, descrevendo o peculiar tropismo do microrganismo pelo tecido adiposo (ANDRADE; SILVA, 1995).

Somente anos depois, Combs e colaboradores então descrevem em seu trabalho que tripomastigotas de *T. cruzi* infectam o tecido adiposo e adipócitos (COMBS *et al.*, 2005). Neste trabalho, os autores ressaltam que pouca atenção era dada ao papel dos adipócitos na patogênese da doença de Chagas e suas alterações metabólicas associadas, e então performaram experimentos de infecção *in vitro* em modelo de cultura de células 3T3-L1 e *in vivo* em modelo murino de infecção, onde descreveram que os adipócitos podem ser infectados com alta eficiência. Micrografias eletrônicas de células infectadas revelaram um alto número de parasitas intracelulares aglomerados ao redor de corpúsculos lipídicos. Além disso, os dados mostraram

que os adipócitos infectados apresentaram mudanças nos níveis de expressão de diferentes proteínas dos adipócitos e descrevem que estas células são importante alvo celular na infecção aguda da doença, com influência no padrão da produção de adipocinas. Durante a infecção em camundongos, o tecido adiposo apresenta um perfil metabólico único, com alto grau de inflamação, hipoadiponectinemia, hipoglicemia e hipoinsulinemia, porém com depuração de glicose relativamente normal durante testes orais de tolerância à glicose. Os autores apontam também que durante a infecção crônica, os adipócitos podem representar um importante reservatório a longo prazo para os parasitas, a partir do qual podem ocorrer recidivas da infecção.

Outro trabalho descreveu a resposta do tecido adiposo durante infecção por *T. cruzi*. Dados de Nagajyothi e colaboradores mostraram que ambos os tecidos adiposos marrom e branco são alvos de infecção dos parasitas em modelo murino, com alta carga parasitária durante o estado agudo da infecção. Também descrevem significativo aumento de macrófagos no tecido adiposo e redução do acúmulo lipídico, tamanho dos adipócitos e gordura corporal, com aumento da expressão de enzimas lipolíticas e alterações na produção e expressão de PPAR $\gamma$ , que aparece aumentado, e adiponectina, se apresentando com níveis reduzidos. Além disso, níveis de expressão gênica de citocinas e quimiocinas e seus receptores também foram demonstrados aumentados no modelo já nos estágios iniciais da infecção (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

A infecção por *T. cruzi* em camundongos demonstrou aumento de marcadores de estresse oxidativo em tecido adiposo marrom e branco como mostrado nos dados de Wen e colaboradores. O grupo avaliou camundongos após 15, 30 e 130 dias de infecção pelo parasita, demonstrando aumento desses marcadores em todos os tempos em ambos os tecidos avaliados (WEN, JIAN JUN *et al.*, 2014). Além de estudos em modelo murino, o tecido adiposo também já foi descrito como reservatório do patógeno durante a fase crônica da doença em humanos. No trabalho, o grupo demonstra a persistência de *T. cruzi* no tecido adiposo de pacientes idosos com doença de Chagas crônica cardíaca, sugerindo que o parasita pode persistir no tecido adiposo por décadas, se tornando um importante reservatório durante a infecção (FERREIRA *et al.*, 2011).

Por muitos anos uma associação entre a infecção de *T. cruzi* em humanos com obesidade e diabetes era suspeita, e acredita-se que a incidência de diabetes seja maior na população



chagásica. De fato, houveram trabalhos indicando que a diabetes é mais comum nessa população (DOS SANTOS *et al.*, 1999). Interessantemente, estudos prévios em laboratório já haviam demonstrado que quando camundongos diabéticos são infectados com *T. cruzi*, eles apresentam mais alta parasitemia e mortalidade (TANOWITZ *et al.*, 1988).

Em outro estudo, a infecção por *T. cruzi* em camundongos diabéticos obesos e diabéticos deficientes de receptor de leptina levaram a uma maior mortalidade dos animais, que apresentaram aumento da parasitemia e parasitismo de tecidos. Foi observada também a redução na gordura corporal e glicose sanguínea nos camundongos diabéticos, além de níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas significativamente aumentados, correlacionando a resistência à leptina com a obesidade e diabetes no modelo estudado (NAGAJYOTHI *et al.*, 2010). No entanto, os mecanismos envolvidos nestas observações continuam desconhecidos e ainda não é possível associar obesidade a severidade da infecção por *T. cruzi*.

A infecção pelo parasita extracelular *T. brucei* causa a tripanossomíase Africana, ou doença do sono, uma doença tropical negligenciada que é quase sempre fatal se não tratada, com patogênese descrita por parasitas vivendo no sangue, sistema linfático e espaços intersticiais de órgãos, mas que podem penetrar no cérebro causando anormalidades neuropsiquiátricas e na regulação do sono (KENNEDY, 2013).

Recentemente, o tecido adiposo também foi descoberto como importante nicho de infecção por este patógeno (TRINDADE *et al.*, 2016). Utilizando um modelo murino, os autores descrevem o tecido adiposo como importante reservatório do patógeno, que após se acumular no tecido, apresenta remodelação da expressão de genes de forma distinta das formas infectantes do parasita no sangue. Uma das alterações é a regulação positiva de genes relacionados a enzimas da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, com formação de moléculas intermediárias desta via, sugerindo que se utilizam dos ácidos graxos como fonte nutricional. Os dados mostraram por PCR quantitativo que o tecido adiposo abriga em torno de 10 vezes mais parasitas que o número médio encontrado no sangue em estágios crônicos da doença.

Simultaneamente, os parasitas obtidos do tecido adiposo foram capazes de se replicar e infectar camundongos saudáveis. Este trabalho reforça o envolvimento do tecido adiposo como a possível explicação para a perda de peso associada aos pacientes, característica típica na doença que, porém, ainda não é compreendida (KENNEDY, 2013). Não há estudos epidemiológicos com pacientes de tripanossomíase africana para avaliar se o número ou severidade de casos da

doença estejam relacionados com o índice de massa corporal antes da infecção, mas evidências em camundongos descrevem que a infecção por *T. brucei* em camundongos obesos e diabéticos resultou em uma diminuição da mortalidade comparados aos selvagens, sugerindo um papel protetor do tecido adiposo (AMOLE *et al.*, 1985).

Além dos protozoários mencionados, outro gênero foi descrito associado ao tecido adiposo em sua patogênese, o *Plasmodium spp.*, parasita intracelular obrigatório e agente causador da malária. Mais de uma espécie do protozoário pode causar a malária em humanos sendo o *P. falciparum* associado à forma mais grave da doença, responsável pela maioria das mortes por malária globalmente.

O *P. falciparum* se multiplica rapidamente na corrente sanguínea, destruindo de 2% a 25% do total de hemácias (glóbulos vermelhos), provocando um quadro de anemia grave. Além disso, os glóbulos vermelhos parasitados pelo protozoário sofrem alterações em sua estrutura causando citoaderência a células endoteliais que revestem vasos sanguíneos de diferentes órgãos. Chamado de sequestro, esta característica pode facilitar a multiplicação do parasita, evitando a remoção dessas células infectadas, gerando pequenos coágulos que podem levar a trombozes e embolias (HO; WHITE, 1999). Um estudo *in vivo* utilizando modelo de infecção em macacos descreve a presença do patógeno nas formas trofozoíta e esquizontes no tecido adiposo (MILLER, LOUIS H, 1969). Exames de autópsia de tecidos obtidos de indivíduos que faleceram de malária revelam sequestro de células vermelhas infectadas por *P. falciparum* bastante aumentado em vasos sanguíneos do tecido adiposo subcutâneo (WILAIRATANA *et al.*, 2000). Enquanto o pulmão e baço são reconhecidos como os principais sítios de acúmulo de *P. falciparum*, o tecido adiposo tem também sido identificado como sítio para sequestro de células vermelhas infectadas por ele. A aderência de células vermelhas infectadas por *Plasmodium* aos vasos do hospedeiro, ocorre em pequenos capilares e veias pós capilares de muitos órgãos sendo o CD36 um dos receptores que mantém estável a aderência estacionária das células vermelhas infectadas (WILAIRATANA *et al.*, 2000).

Um estudo que aplicou técnicas de imagem *in vivo* em tempo real em animais de laboratório infectados que expressavam ou não CD36 revelaram que o receptor tem papel importante no sequestro de parasitas de malária *P. berghei*, espécie utilizada para estudar a doença em modelo de roedores, especificamente no tecido adiposo e pulmões. Nos animais deficientes em CD36 o sequestro de células vermelhas infectadas nos pulmões e no tecido

adiposo foi significativamente reduzido. Neste estudo é revelado que, como esperado, o pulmão é o principal sítio, mas inesperadamente o tecido adiposo contribui significativamente para o sequestro desses parasitas (FRANKE-FAYARD *et al.*, 2005).

### 1.1.7.2 Vírus: HIV, Citomegalovírus e Influenza A

A relação entre o tecido adiposo e infecções virais tem sido investigada. Pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente causador da AIDS, importante patologia que representa um problema de saúde pública mundial, sofrem diversas alterações metabólicas incluindo dislipidemia, resistência à insulina e lipodistrofia, que foram inicialmente consideradas reações adversas à fármacos antirretrovirais (FALUTZ, 2011; SAMARAS *et al.*, 2007). No entanto, a presença de alterações metabólicas em pessoas infectadas por HIV livre desse tratamento sugere que o vírus tem impacto direto. A persistência viral em reservatórios impede sua erradicação e a inflamação crônica em pacientes em terapia antirretroviral se apresentam como aspectos preponderantes na patologia da doença (SILICIANO; GREENE, 2011), tendo emergido então a avaliação do papel do tecido adiposo neste ponto.

Alguns pesquisadores buscaram determinar se o HIV infecta adipócitos, o que poderia explicar a ampla perturbação da biologia do tecido pelo vírus ou pela toxicidade dos medicamentos. Inicialmente, estudos demonstraram que os adipócitos expressam os correceptores requeridos para entrada do HIV, CD4, CXCR4 e CCR5 (HAZAN *et al.*, 2002). A expressão desses receptores *in vivo* também foi demonstrada em amostras de tecido adiposo humano por imunohistoquímica (MAURIN *et al.*, 2005). No entanto, o mesmo grupo de autores concluíram que a infecção *in vivo* do tecido adiposo com o vírus não foi possível pois os níveis de expressão desses receptores não permitiu a entrada do vírus em adipócitos maduros localizados no tecido adiposo subcutâneo, não havendo até então a descrição da detecção direta do HIV em adipócitos *in vivo* (MUNIER *et al.*, 2003). A propagação de proteínas virais também já foi investigada, com descrição de proteínas como *Vpr* e *Nef* no tecido adiposo de pacientes infectados, com impacto negativo na homeostase adiposa (AGARWAL *et al.*, 2013; CUI *et al.*, 2014).

As evidências indicam que os adipócitos possam ter papel importante na infecção por HIV uma vez que são observadas mudanças significantes na morfologia do tecido adiposo como o aumento nos níveis de fibras de colágeno e densidade de vasos, além do metabolismo dos indivíduos infectados (JAN *et al.*, 2004). Enquanto dados demonstram que a lipodistrofia associada à infecção pelo HIV seja relacionada com a perda de tecido adiposo periférico com concomitante aumento na adiposidade visceral (GRINSPOON; CARR, 2005), outros demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo e os depósitos centrais são afetados, ocorrendo sua redução (BACCHETTI *et al.*, 2005). Níveis de leptina foram mostrados significativamente mais altos em pacientes infectados por HIV com lipodistrofia, e estes níveis estavam negativamente correlacionados com a resistência à insulina (KOSMISKI *et al.*, 2003), enquanto níveis de adiponectina apareceram reduzidos em pacientes infectados com HIV com lipodistrofia e positivamente correlacionados com resistência à insulina (MYNARCIK *et al.*, 2002). Os mecanismos fundamentais para estes fenômenos metabólicos continuam pouco compreendidos e precisam ser melhor investigados.

Por haver poucas descrições sobre a infecção por HIV no tecido adiposo e os mecanismos que levem sua persistência nas células do tecido, Damouche e colaboradores focaram nesta investigação mais recentemente. O grupo analisou o impacto da infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) no tecido adiposo subcutâneo abdominal e visceral de macacos e descreveram que os adipócitos e células imunes do tecido adiposo são afetadas, onde a densidade dos adipócitos se mostrou elevada e as células imunes do tecido adiposo apresentaram aumento na ativação e/ou perfil inflamatório (DAMOUCHE *et al.*, 2015).

Investigando amostras de pacientes infectados por HIV em terapia antirretroviral, os mesmos pesquisadores detectaram material genético do vírus associado às células da fração vascular estromal do tecido adiposo como as células T CD4+ e macrófagos do tecido. Além disso, após isolar células T CD4+ de tecido adiposo de pacientes tratados por antirretrovirais foi possível observar a reativação *ex vivo* das partículas virais obtidas destas células infectadas (DAMOUCHE *et al.*, 2015). Com estas importantes observações, o grupo enfatiza o potencial papel do tecido adiposo como cofator para a persistência, ativação e inflamação crônica durante a infecção por HIV. Dados semelhantes foram obtidos por Couturier e seu grupo, que confirmaram a presença de células T CD4+ de memória ativadas, assim como DNA de HIV na fração vascular estromal do tecido adiposo de pacientes em terapia antirretroviral. Em sistema de cocultura, identificaram também que os adipócitos aumentavam a ativação de células T

CD4+ e sua viabilidade, além de estimular a replicação do vírus, sugerindo o tecido adiposo como um vasto reservatório para persistência de HIV (COUTURIER *et al.*, 2015). Considerando isto, o mesmo grupo em novas investigações descreveu também que os adipócitos prejudicam a eficácia de medicamentos antirretrovirais, o que poderia contribuir para a persistência viral no tecido adiposo (COUTURIER; LEWIS, 2018). Em contrapartida aos dados descritos, Hsu e colaboradores, usando o modelo de infecção por HIV em macacos demonstraram um aumento de células T CD4+ e material genético viral no tecido adiposo subcutâneo dos animais durante a fase aguda de infecção, mas apontaram que as células contendo esse material viral eram raras, podendo ser consequência secundária a uma resposta inflamatória aguda, afirmando ser improvável que o tecido adiposo represente um reservatório de células produtivamente infectadas pelo vírus (HSU *et al.*, 2017).

Em trabalho mais recente, Gorwood e autores mostraram em modelo de infecção em macacos que os animais infectados apresentavam tecido adiposo com adipócitos pequenos, redução da adipogênese e severa fibrose com deposição de colágeno e amostras de pacientes em terapia antirretroviral com alterações semelhantes, demonstrando efeitos específicos ocasionados diretamente pela infecção viral (GORWOOD *et al.*, 2019). As considerações acerca da persistência do vírus HIV no tecido adiposo e suas implicações metabólicas e na patogênese da doença são mais profundamente discutidas em trabalhos de revisão disponíveis (BOURGEOIS *et al.*, 2019; COUTURIER; LEWIS, 2018).

O citomegalovírus (CMV) é um herpesvírus que infecta a maioria da população mundial, com alta prevalência observada em adultos mais velhos (CANNON *et al.*, 2010). A infecção deste vírus no tecido adiposo também foi descrita associada com a infiltração e/ou expansão local de células T CD8, com o desenvolvimento de resposta pró-inflamatória e alterações metabólicas. É conhecida a ocorrência de uma resposta imune adaptativa vigorosa durante a progressão da infecção por CMV dos estados agudos para os latentes, impulsionada em grande parte por células T CD8 que residem na glândula salivar e nos pulmões de camundongos infectados. No entanto, o papel das células T CD8 residentes em tecidos como um mecanismo de defesa contínuo contra o CMV não havia sido investigado em outros locais anatômicos.

Contreras e colaboradores então identificaram locais adicionais da residência de células T anti-CMV e descreveram as consequências fisiológicas dessa resposta, demonstrando o papel

do tecido adiposo como importante alvo na infecção. Através da técnica de RT-qPCR, observaram que amostras de tecido adiposo visceral de camundongos estavam infectados dias após a infecção por injeção intraperitoneal, resultando em uma maior presença de leucócitos *in situ*. Além disso, por análise de citometria de fluxo observaram que o tecido adiposo se enriqueceu em células T CD8 citotóxicas, com antígenos específicos de CMV da fase aguda à crônica de infecção, e que estas células apresentavam marcadores de residência no tecido. Além disso, viram que as citocinas inflamatórias se apresentaram elevadas juntamente com a expansão das células T CD8. Adicionalmente, descreveram uma correlação entre o estado inflamatório do tecido adiposo em resposta à infecção pelo vírus e o desenvolvimento de hiperglicemia nos camundongos (CONTRERAS *et al.*, 2019).

Outra evidência de infecção viral no tecido adiposo se dá pelo trabalho de Ayari e seu grupo, que descreve alterações no metabolismo energético e características dos adipócitos após infecção pelo vírus influenza A. O trabalho utiliza o modelo de infecção murino e os dados obtidos mostram que a infecção por influenza induziu alterações no metabolismo de glicose do organismo e que persistiu por muito tempo mesmo após o vírus ter sido removido.

Foram observadas mudanças na expressão de diversos genes, com perfil específico dependendo do depósito de tecido adiposo infectado, dentre estes a repressão da transcrição de genes das enzimas lipolíticas e genes lipogênicos. Mais notavelmente, foi caracterizado o aparecimento de adipócitos semelhantes ao fenótipo multilocular termogênico dentro do tecido adiposo subcutâneo. Detectaram células com RNA viral e abrigando antígenos virais no tecido adiposo dos animais e, usando técnicas *in vitro*, reportaram que a infecção por influenza A estimulou a expressão de genes relacionados com a diferenciação de adipócitos multiloculares em pré-adipócitos (AYARI *et al.*, 2020).

A descrição do tecido adiposo como contribuinte na patogênese de infecções virais ainda é recente na literatura, no entanto existem evidências importantes de que seja um tecido ainda negligenciado que merece ser melhor estudado para novos esclarecimentos a respeito do estabelecimento destes agentes infecciosos nos hospedeiros.

### **1.1.7.3 Bactérias: *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus aureus*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium tuberculosis***

Finalizando o tópico sobre a diversidade de microrganismos descritos com patogênese associada ao tecido adiposo, diferentes bactérias também já foram relacionadas a este fenômeno. Em 2010, Bechah e seu grupo sugeriu que o tecido adiposo pode ser um potencial reservatório para o estado latente de infecção de *Rickettsia prowazekii*, agente causador de tifo epidêmico, uma doença infecciosa negligenciada que tipicamente ocorre em hospedeiros que vivem em condições de vulnerabilidade anos ou décadas após a infecção (AKRAM *et al.*, 2020). Como o mecanismo de reativação e reservatório celular durante a latência da bactéria ainda não é bem compreendido, os autores demonstraram em modelo murino que o tecido adiposo pode servir como reservatório para o estágio de dormência da infecção. A bactéria foi detectada por técnicas de PCR, cultura celular e imunohistoquímica no tecido adiposo dos animais 4 meses após a recuperação clínica da infecção primária. Em experimentos *in vitro* observaram que a bactéria infectou e se replicou em adipócitos murinos de linhagem 3T3-L1 (BECHAH *et al.*, 2010).

A persistência de *Coxiella burnetii* em tecido adiposo murino também foi descrita pelo mesmo grupo de trabalho. A bactéria é o agente causador da febre Q, zoonose conhecida por persistir em humanos e roedores, tendo seu reservatório celular nos hospedeiros ainda indeterminado (RAOULT *et al.*, 2005). O tecido adiposo de camundongos infectados por rota intraperitoneal ou intratraqueal foi avaliado e detectada a presença da bactéria meses após a infecção. A bactéria *C. burnetii* foi detectada no tecido adiposo abdominal, inguinal e dorsal, enquanto nenhuma bactéria foi detectada no sangue, fígado, pulmões ou baço independentemente da via de inoculação.

A transferência do tecido adiposo abdominal de camundongos infectados para camundongos *naive* imunodeficientes resultou na infecção destes animais. Os dados sugerem que *C. burnetii* infecta adipócitos *in vivo* pois foram encontradas bactérias nos adipócitos do tecido adiposo, além disso o microrganismo foi capaz de se replicar em adipócitos *in vitro*. Em adição, a bactéria induziu um programa transcricional específico *in vivo* no tecido adiposo e nos adipócitos *in vitro*, principalmente em categorias de genes associados à resposta inflamatória, resposta hormonal e citoesqueleto. Com este trabalho os autores sugerem que a recidiva frequente da doença mesmo após terapia com antibiótico a longo prazo pode ser

explicada pela ineficácia destes fármacos em penetrarem no tecido adiposo, propondo novas perspectivas para o entendimento da doença e tratamento dos pacientes (BECHAH *et al.*, 2014).

O trabalho de Zhang e colaboradores descrevem a função protetora de adipócitos contra a infecção por *Staphylococcus aureus* na pele (ZHANG *et al.*, 2015). A bactéria é frequentemente encontrada colonizando a pele humana, porém infecções com sua forma resistente a meticilina (MRSA) é um importante problema clínico e responsável por uma taxa considerável de mortes (MILLER; CHO, 2011). Neste trabalho, os autores utilizam um modelo murino de infecção por MRSA e observam uma rápida proliferação de pré-adipócitos e expansão da camada de gordura dérmica pelo acentuado aumento de tecido adiposo. Observaram que a adipogênese dessas células foi parcialmente estimulada devido ao fator de transcrição ‘dedo de zinco’ 423 (ZFP423), cuja expressão controla a transcrição de PPAR $\gamma$ .

Dessa forma, utilizando como modelo camundongos com mutação no gene de transcrição de ZFP423, além de também camundongos tratados com inibidores de PPAR $\gamma$ , os autores confirmaram que estes fatores são essenciais na expansão de tecido adiposo dérmico em resposta à infecção por MRSA, pois os animais com adipogênese prejudicada foram mais susceptíveis à infecção. Adicionalmente, descreveram a função de defesa pelos adipócitos com a produção do peptídeo antimicrobiano catelicidina, confirmada pela análise em animais *Camp* (*knockout* para o gene da catelicidina), os quais perderam a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, sugerindo assim que adipócitos da pele participam diretamente na resposta inata contra *S. aureus* (ZHANG *et al.*, 2015).

Um grupo de pesquisadores descreveu o tecido adiposo como primeiro sítio de colonização de *Leptospira interrogans* em modelo de infecção de hamsters. A bactéria *L. interrogans* é uma espiroqueta patogênica causadora da leptospirose, uma das mais abrangentes e potencialmente fatais zoonoses no mundo (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). O hamster é o modelo mais aceito para estudar a doença. O grupo utilizou um sistema de imagem *in vivo* para observar todo o corpo dos animais infectados com *L. interrogans* bioluminescentes e assim identificar a colonização e sítios de crescimento da bactéria durante a fase aguda de infecção. Os resultados mostraram que a luminescência das leptospiras se espalhou pelo corpo de cada animal sequencialmente. As bactérias luminescentes foram primeiramente detectadas no sítio de injeção e depois se espalharam para o centro do abdômen, na área do fígado. Nas análises, a luminescência das bactérias foi detectada no tecido adiposo



mais precocemente que em outros órgãos, indicando que as leptospiras colonizaram o tecido adiposo nos estágios iniciais de leptospirose. Além disso, culturas do tecido adiposo se tornaram positivas na análise de UFC (unidade formadora de colônia) mais precocemente que culturas do sangue dos animais infectados. Adicionalmente, análises de microscopia revelaram que as leptospiras colonizaram as paredes internas dos vasos sanguíneos no tecido adiposo. Este trabalho foi o primeiro estudo reportando significativo envolvimento do tecido adiposo na infecção por leptospiras, abrindo novos componentes de estudo para compreensão de mecanismos patológicos em sua colonização (OZURU *et al.*, 2017).

Alguns estudos têm apontado importantes hipóteses do envolvimento do tecido adiposo na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Acredita-se que um quarto da população mundial seja infectada por *M. tuberculosis*, o agente causador da tuberculose. No entanto, 90% destes infectados terão somente a forma latente da doença, pois a micobactéria tem habilidade de persistir em seu hospedeiro humano por longos períodos e pouco é conhecido sobre a localização do *M. tuberculosis* em indivíduos com infecção latente. A longa persistência micobacteriana nos pulmões já foi reportada, mas pode não ser suficiente para explicar a tuberculose extrapulmonar, que representa até 15% dos casos de reativação (HOPEWELL, 1994; HOUBEN; DODD, 2016).

Em 2006, Neyrolles e colaboradores estudando amostras de autópsias de indivíduos que morreram por outras causas que não tuberculose, utilizaram PCR *in situ* e mostraram a presença de DNA de *M. tuberculosis* no tecido adiposo dos rins, estômago, linfonodos, coração e pele. Suas análises *in vitro* utilizando uma combinação de modelos de adipócitos, incluindo a linhagem 3T3-L1 assim como adipócitos primários humanos, demonstraram que, após se ligar a receptores *scavengers*, família diversa de receptores de superfície celular, a micobactéria entra nos adipócitos e acumula lipídeos citoplasmáticos, onde é capaz de sobreviver em estado não replicativo, sendo dessa forma insensível a ação da droga antibacteriana isoniazida. Com estes resultados, o grupo sugere que o tecido adiposo pode constituir um vasto reservatório onde o *M. tuberculosis* pode persistir por longo tempo em estado latente, evitando ser morto por drogas antimicrobianas ou ser reconhecido pelo sistema imune (NEYROLLES *et al.*, 2006).

Outros estudos com animais reforçam ainda mais a tese de que o tecido adiposo pode ser reservatório de *M. tuberculosis*. Em um trabalho com camundongos, os investigadores avaliaram como a micobactéria era disseminada dos pulmões para o tecido adiposo e de volta

para os pulmões. Neste estudo, os camundongos foram infectados com várias doses de *M. tuberculosis* intra-nasal e em 7 semanas o bacilo pôde ser detectado em vários tecidos adiposos distantes dos pulmões. No mesmo estudo, implantes de pré-adipócitos contendo a micobactéria foram inseridos subcutaneamente em camundongos livres do bacilo. Após 5 semanas da inserção, a infecção pelo *M. tuberculosis* foi detectada nos pulmões, indicando que ele pode se disseminar dos pulmões para o tecido adiposo e de volta para os pulmões (AGARWAL *et al.*, 2016).

Em um trabalho mais recente, os autores mostraram que em modelo de infecção de adipócitos *in vitro*, aproximadamente 80% dos bacilos *M. tuberculosis* foram fagocitados em 24 horas, consistente com os dados apresentados no trabalho de Neyrolles e seu grupo. Utilizando modelo de infecção por aerossol em camundongos, observaram abundante infecção no tecido adiposo perigonadal dos animais, com a presença da micobactéria em ambas as frações adiposa e vascular estromal dos tecidos analisados. Além disso, observaram mudanças na expressão de genes micobacterianos em resposta ao estresse oxidativo, com indução desses genes nas micobactérias que infectam o tecido adiposo, sugerindo sua adaptação ao ambiente de estresse celular para sobrevivência. Adicionalmente, observaram que a infecção por *M. tuberculosis* no tecido adiposo foi associada com a infiltração de fagócitos mononucleares, células T CD8+ responsivas ao bacilo e células NK que se tornaram ativadas, sugerindo que o tecido adiposo sofre mudanças inflamatórias durante a infecção por *M. tuberculosis* que o induzem a se manter em estado latente nos adipócitos (BEIGIER-BOMPADRE *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos sugerem que a desnutrição que é comumente associada com a perda de tecido adiposo pode ter uma relação bidirecional com a tuberculose (TVERDAL, 1986; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2017). Além disso, entre pacientes acometidos pela tuberculose a redução de tecido adiposo no início do tratamento está associada com a forma clínica severa e aumento da mortalidade, no entanto há poucos trabalhos que investigam como a perda de tecido adiposo poderia influenciar no desenvolvimento da patologia. Em um estudo com camundongos transgênicos com carência na formação do tecido adiposo, a perda de adipócitos foi associada com a redução da taxa de *M. tuberculosis* no tecido adiposo, mas com aumento da carga do bacilo, assim como uma piora da patologia nos pulmões, sugerindo, portanto, que a perda da massa de gordura pode prejudicar a homeostase imunológica e aumentar a vulnerabilidade de reativação da forma latente ou progressão da infecção primária, levando ao desenvolvimento da tuberculose (PATON; NG, 2006; AYYAPPAN *et al.*, 2019).

Apesar de excepcionais, há importantes evidências de que a biologia do tecido adiposo, e os adipócitos em especial, podem contribuir para os mecanismos de infecção de diversos patógenos. Novos estudos que explorem a contribuição do tecido para o estabelecimento de doenças infecciosas são necessários para o desenvolvimento de modelos experimentais que podem fornecer maior compreensão para a prevenção e tratamento de patologias.

## 1.2 Hanseníase

A hanseníase é a doença humana cuja descrição é a mais antiga, marcada pelo estigma aos seus portadores que eram isolados da sociedade por preconceito ao seu fenótipo de manifestações clínicas e inexistência de tratamento. Também conhecida como Mal de Hansen, somente após a descoberta de seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, pelo médico bacteriologista e dermatologista Gerhard Hansen em 1873, que sua etiologia foi associada a um microrganismo. Sua prevenção se manteve limitada ao isolamento em leprosários dos pacientes, que recebiam assistência precária até meados do século XX (EIDT, 2004; QUEIROZ; PUNTEL, 1997; SCOLLARD *et al.*, 2006).

No Brasil, na década de 1960, o pesquisador Abraão Rotberg, visando diminuir o estigma aos portadores introduziu a substituição do termo 'lepra' por hanseníase, em referência ao descobridor do agente causador da doença, tendo sua nova terminologia aprovada pelo Ministério da Saúde do país em 1976, tendo se tornado obrigatória em território nacional por lei federal a partir de 1995 (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005).

O tratamento para a hanseníase deu início com a introdução das sulfonas, utilizando dapsona e seus derivados, no final dos anos 1940, se tornando o principal medicamento para o controle da doença na década de 1950. Posteriormente, a partir de 1962, a clofazimina testada por Browne e Hogerzeil (BROWNE; HOGERZEIL, 1962) e a rifampicina, por Opromolla e seu grupo (OPROMOLLA, 1965) também começaram a ser utilizadas no tratamento da doença. A monoterapia, no entanto, apresentava-se como a causa mais frequente de desenvolvimento da resistência microbiana ao medicamento. A partir desse fato, a OMS introduz então a quimioterapia conhecida como poliquimioterapia (PQT/OMS), que consiste no uso destes três fármacos combinadas (WHO, 1982).

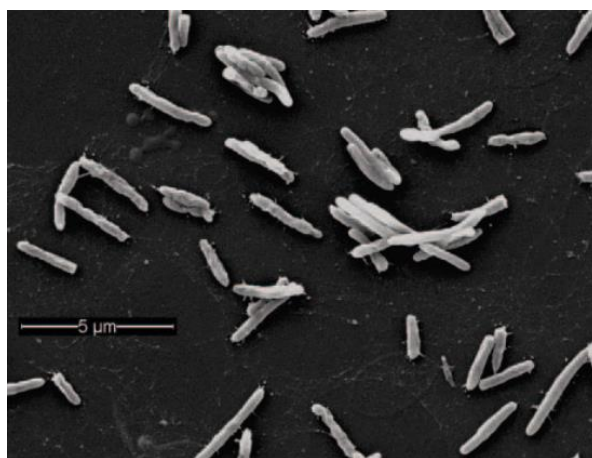
Com a indicação da PQT pela OMS a partir de 1981, porém implementada no Brasil somente a partir dos anos 1990 pelo Ministério da Saúde, ocorreram mudanças significantes do quadro da doença, que deixou então de ser controlada pelo isolamento e segregação dos doentes em leprosários. Passou a ter tratamento eficiente e cura, tendo sido erradicada em diversos países. A multidrogaterapia (poliquimioterapia ou PQT) torna o *M. leprae* inviável, porém não recupera ou reverte as deformidades físicas já desenvolvidas nos indivíduos doentes. Concomitante ao tratamento farmacológico, medidas de avaliação e prevenção das incapacidades físicas e atividades de educação para a saúde, incluindo o autocuidado, são fatores necessários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

### 1.2.1 Etiologia

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que em humanos afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, devido a infecção do *M. leprae* a macrófagos de pele e células de Schwann. O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo álcool-ácido resistente (BAAR) e parasita intracelular obrigatório de crescimento lento, apresentando tempo de replicação de aproximadamente 13 dias (figura 1.8). Possui boa adaptação a regiões mais frias do corpo apresentando temperatura de crescimento ótimo em torno de 33°C (REES, 1985; SCOLLARD *et al.*, 2006).

**Figura 1.8: Morfologia de *Mycobacterium leprae*.** Microscopia eletrônica de *Mycobacterium leprae* derivado de pata de camundongo nude. Fonte: Scollard *et al.* (2006).

Apesar de ter sido um dos primeiros patógenos descritos pela humanidade, ainda hoje



existem muitos questionamentos sobre os mecanismos relacionados à sobrevivência intracelular, interação com a resposta imune do hospedeiro e transmissão. Isso se deve às dificuldades relacionadas ao avanço nos estudos científicos sobre sua patogenicidade, inerentes ao fato da micobactéria não ter sido cultivada em *in vitro* por longos períodos até o momento. O

*M. leprae* foi cultivado pela primeira vez por Shepard (SHEPARD, 1960), que fez sua inoculação em coxim plantar de camundongos de linhagem BALB/c e observou a multiplicação localizada das micobactérias, o que permitiu maiores avanços em evidências sobre o patógeno. O modelo de inoculação de *M. leprae* em coxim plantar de camundongos *nude* (nu/nu), que não possuem resposta imune celular, tem sido utilizado para cultivo da micobactéria em laboratório (JOB *et al.*, 1990). Ainda, tatus de nove-bandas (*Dasybus novemcinctus*) (BALAMAYOORAN *et al.*, 2015), esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) (AVANZI *et al.*, 2016) e primatas não humanos (HONAP *et al.*, 2018) foram descritos como reservatórios naturais de *M. leprae*, além do ser humano. Por outro lado, o *M. leprae* apresenta pouca variabilidade genética e baixa virulência, apresentando redução de seu genoma, composto por aproximadamente 50% de seu conteúdo formado por pseudogenes, que perderam sua função pelo acúmulo de mutações, o que pode explicar sua dependência ao espaço intracelular e, conseqüentemente, ao metabolismo da célula hospedeira (COLE *et al.*, 2001; EAPEN, 2012).

O *M. leprae* era o único agente causador conhecido da doença até 2008, quando uma segunda espécie, o *M. lepromatosis*, foi identificada no México. Apesar das bactérias serem classificadas como espécies diferentes por conta de suas sequências de DNA, ambas possuem muitas características semelhantes e causam a mesma doença clínica (HAN *et al.*, 2008, 2015). A espécie *M. lepromatosis* foi recentemente descoberta presente em pacientes com hanseníase que tiveram a forma difusa de Lucio, uma reação necrosante grave rara que pode ocorrer em pacientes com a doença sem tratamento (AZULAY-ABULAFIA, 2005; GILLIS *et al.*, 2011). Esta forma da doença ainda requer maiores investigações, portanto não será aqui discutida a fundo.

### **1.2.2 Epidemiologia**

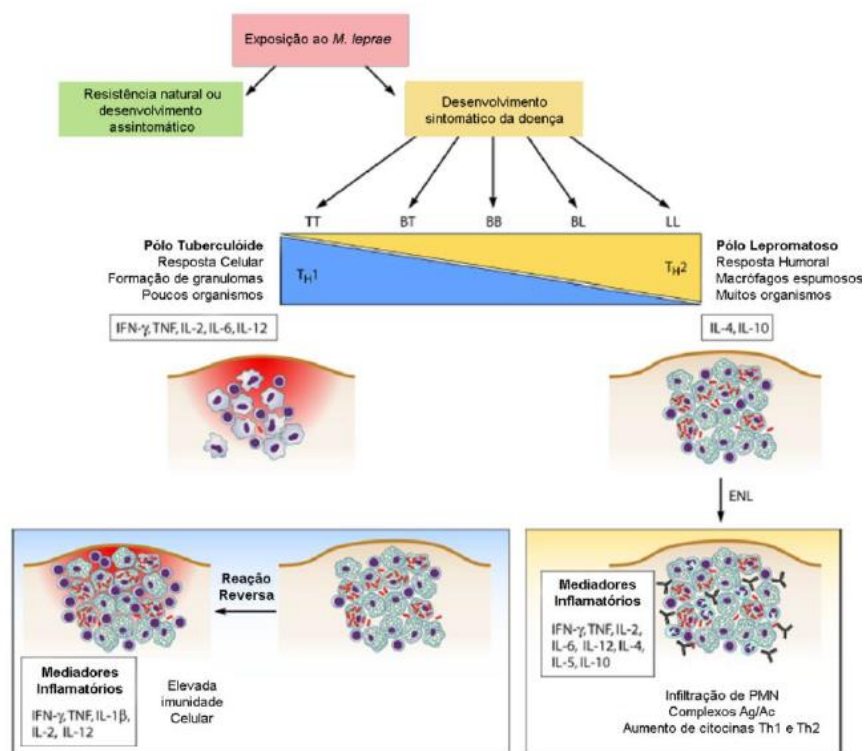
Apesar da hanseníase ser uma doença tratável, ainda se mantém como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Sua prevalência foi extensamente diminuída após a implementação da poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no começo dos anos 1980 (DAUMARIE, 2004). Dados epidemiológicos mais atuais registram uma prevalência de 0,24 casos por 10.000 habitantes, com 208.619 novos casos de hanseníase registrados globalmente em 2018, afirmando que a transmissão da doença ainda permanece constante (WHO, 2019). No Brasil, foram registrados 27.864 novos casos da doença em 2019

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021), mantendo o país no segundo lugar no ranking mundial de detecção de novos casos de hanseníase, atrás somente da Índia. Com a eficácia do tratamento utilizando a poliquimioterapia, a meta de eliminação da hanseníase para redução da prevalência a 1 caso da doença a cada 10 mil habitantes, definida em assembleia internacional da OMS realizada em 1991 (WHO, 1991), foi alcançada a nível global. No entanto, em áreas onde a doença permanece endêmica esta meta ainda não foi alcançada, como por exemplo o Brasil, que registrou uma prevalência de 1,2 casos por 10 mil habitantes na análise epidemiológica global mais recente (WHO, 2019). Vale mencionar que, apesar de milhões de pessoas já terem sido consideradas curadas pela doença, muitos destes indivíduos permanecem com incapacidades motoras irreversíveis, devido ao dano neural, absorção óssea, perda da função motora e dor neuropática crônica, além do estigma social, complicações da doença que requerem cuidados ao longo de toda a vida (SALES *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Patogênese

Apesar do *M. leprae* não apresentar grande variabilidade genética em seu genoma (COLE *et al.*, 2001), sua interação com o hospedeiro é responsável pela sintomatologia característica na hanseníase, que apresenta manifestações clínicas muito diversas. Estudos indicam que o bacilo possa ser transmissível pelo contato próximo e prolongado entre um indivíduo susceptível e um paciente infectado através de perdigotos ou por secreção nasal, sendo a mucosa nasal sua principal porta de entrada ao hospedeiro humano (SHEPARD, 1962; MARTINS *et al.*, 2010). A infecção do *M. leprae* em macrófagos e células de Schwann provoca lesões na pele e neuropatia periférica que pode levar a incapacidades após ocorrência de dano neural irreversível. Devido a multiplicação lenta do bacilo, a doença possui período de incubação longo e variável, podendo chegar a 10 anos. Uma diversa variedade de manifestações clínicas e histopatológicas pode ocorrer na doença, devido aos diferentes graus de resposta imune celular que o indivíduo pode apresentar contra a infecção do *M. leprae*, o que levou a diferentes propostas de classificações para os pacientes com hanseníase ao longo dos anos (SCOLLARD *et al.*, 2006; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

O sistema de classificação proposto por Ridley & Jopling (1966) é utilizado nas pesquisas e leva em consideração a doença baseada em critérios clínicos, imunológicos e histopatológicos, onde o polo da forma tuberculóide (TT) apresenta maior resposta imune celular, formação de granulomas e presença de poucos bacilos nas poucas lesões aparentes, enquanto no polo com a forma lepromatosa (LL) há uma resposta imune humoral predominante, com a presença de macrófagos espumosos e a detecção de muitas micobactérias em múltiplas lesões. Entre os polos principais, existem as formas intermediárias divididas em *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL), além da forma indeterminada (I) (figura 1.9) (MISCH *et al.*, 2010).



**Figura 1.9: Classificações clínicas da hanseníase e perfil de resposta imunológica do hospedeiro.** BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; BT: borderline-tuberculóide; LL: lepromatosa-lepromatosa; TT: tuberculóide-tuberculóide; Th1: linfócito T helper 1, Th2: linfócito T helper 2, PMN: Polimorfonucleares, Ag/Ac: antígeno/anticorpo. Adaptado de Misch *et al.* (2010).

Em 1982, a OMS sugeriu uma proposta mais simples, para fins operacionais e terapêuticos, baseada nos sintomas visíveis e no índice baciloscópico (IB) em análises de esfregaços de pele de regiões mais frias do corpo, geralmente lóbulos da orelha, cotovelos e/ou Joelho (WHO, 1982). Esta classificação determina que pacientes que apresentem até 5 lesões na pele e até 2 bacilos detectados nos esfregaços sejam identificados com a forma paucibacilar da doença, e aqueles com mais de 5 lesões e mais de 2 bacilos detectados nas análises de

microscopia dos esfregaços, sejam classificados com a forma multibacilar da doença. No entanto, desde 1988, a OMS recomenda a classificação baseada somente na avaliação clínica por haver regiões onde a análise microscópica de esfregaços de pele não está disponível, estabelecendo assim que casos paucibacilares são os pacientes que apresentam até 5 lesões de pele e/ou apenas uma lesão neural envolvida, enquanto pacientes multibacilares são identificados como aqueles que possuem mais de 5 lesões na pele e/ou mais de uma lesão neural, utilizando a baciloscopia para casos onde a classificação clínica seja difícil (WHO, 1988).

Gupta e colaboradores porém ressaltam que este modelo de classificação baseado somente no número de lesões é bastante arbitrário e pode resultar em subnotificações ou notificações equivocadas das formas clínicas da hanseníase, sugerindo então a adição de novos critérios de avaliação que considerem o tamanho das lesões e acompanhamento do espessamento dos nervos (GUPTA *et al.*, 2012). Além disso, o sistema de classificação da OMS não considera protocolos de tratamento para casos de hanseníase neural pura, onde não há lesões de pele ou manifestações aparentes no indivíduo (PRASAD; KAVIARASAN, 2010). O envolvimento dos nervos é evidente quando a doença começa a progredir, e é medido através da diminuição da sensibilidade (dor, tato, frio ou calor) na área das lesões. No entanto, em alguns casos o acometimento dos nervos pode surgir mais tarde na doença, podendo ocorrer o espessamento dos nervos acompanhado de dor. Evitar o dano aos nervos periféricos é o maior objetivo da clínica atual, e necessita de mais investigação (SAUNDERSON *et al.*, 2008; WILDER-SMITH; VAN BRAKEL, 2008).

Na clínica da hanseníase também podem ocorrer os episódios reacionais, resultantes de episódios agudos de inflamação. Como essas reações afetam a pele e os nervos, são as principais causas de morbidade e danos neurais, podendo ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo depois do paciente ter finalizado seu tratamento. As reações podem ser classificadas como Tipo 1 (Reação Reversa – RR) ou Tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico – ENH ou Eritema Nodoso Leproso - ENL) (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

Investigações indicam que a reação do tipo 1, ou RR, seja resultado de uma hipersensibilidade tardia e aumento da resposta imune celular contra antígenos micobacterianos, podendo causar melhora ou agravamento da doença. Pode ocorrer em pacientes *boderline*, que migram para o polo tuberculoide pela redução da carga bacilar durante o tratamento. Pacientes não tratados podem demonstrar aumento da carga bacilar e as



manifestações clínicas se tornam similares aos de indivíduos do polo lepromatoso devido a deterioração da imunidade celular. A reação do tipo 2, ou ENL, está relacionada a uma complexa resposta de imunidade humoral e também celular (PINHEIRO *et al.*, 2018). Acredita-se que seja uma reação do corpo às substâncias produzidas pela destruição do bacilo, com deposição de complexos imunológicos nos tecidos e subsequente ativação da cascata de coagulação (SILVA *et al.*, 2018). Sua manifestação se apresenta como uma piora repentina geralmente durante o tratamento em indivíduos com a forma lepromatosa, no entanto, as causas e os mecanismos envolvidos nestes episódios ainda não foram profundamente elucidados (FOSS *et al.*, 2003; KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008; NERY *et al.*, 2006).

#### **1.2.4 *Mycobacterium leprae* e o metabolismo lipídico**

Os lipídeos são biomoléculas importantes para muitas funções nas micobactérias seja como fonte nutricional, estrutural, proteção ao ambiente ou virulência, e desempenham papel essencial na patogênese e sobrevivência do *M. leprae* (KAUR; KAUR, 2017). A parede celular do *M. leprae* é semelhante à das outras micobactérias, contendo um envoltório celular extremamente rico em lipídios complexos, conferindo sua resistência a fármacos, à esterilização química e à defesa do hospedeiro (SCOLLARD, 2006). O lipídeo de parede celular que dá especificidade imunológica ao *M. leprae* é o glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1), molécula que pôde ser isolada em altas concentrações da micobactéria purificada e também de tecidos infectados. Acredita-se que seja o principal componente da parede do *M. leprae*, com importante relação na interação entre o patógeno e o hospedeiro (HUNTER; BRENNAN, 1981; GUENIN-MACÉ *et al.*, 2009). O PGL-1 parece ter função na inibição da maturação de fagossomas contendo *M. leprae*, o que ajuda em sua sobrevivência por longos períodos na célula hospedeira (ROBINSON *et al.*, 2008). Além disso, já foi descrito o tropismo do PGL-1 pela laminina, importante glicolipídeo de lâmina basal de células de Schwann, indicando seu possível papel na predileção do *M. leprae* aos nervos periféricos (NG *et al.*, 2000).

Evidências de alterações na homeostase lipídica na infecção por *M. leprae* foram inicialmente observadas pelo médico patologista Rudolf Virchow, em 1863, que descreveu que células de lesões de pele de pacientes da doença apresentavam aparência ‘espumosa’ (VIRCHOW, 1865). Esse fenótipo é característico de macrófagos infectados pelo *M. leprae*, onde ocorre acúmulo de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira induzido pela infecção do

bacilo (SAKURAI; SKINSNES, 1970). Este fenômeno também é observado na infecção em células de Schwann, como evidenciado em biópsias de nervo de pacientes com hanseníase (JOB, 1970).

Assim como a formação de corpúsculos lipídicos é importante para sobrevivência e persistência do *M. tuberculosis* (GARTON *et al.*, 2008; PEYRON *et al.*, 2008), a modulação lipídica da célula hospedeira também se mostra uma estratégia essencial para a patogênese do *M. leprae*. Analisando macrófagos infectados por *M. leprae*, Chatterjee e colaboradores em 1959 revelaram que o bacilo reside e se multiplica dentro de fagossomos lipídicos (CHATTERJEE *et al.*, 1959), fenômeno mais recentemente revisto e aprofundado pelo nosso grupo de pesquisa (MATTOS *et al.*, 2012). Devido a sua redução genética (COLE *et al.*, 2001), o *M. leprae* é dependente do hospedeiro para suas funções metabólicas básicas. Estudos demonstram que diversos genes do metabolismo lipídico do hospedeiro são induzidos na infecção por *M. leprae*, dentre estes, genes de lipases e fosfolipases, que são mais expressos em lesões de pacientes com hanseníase.

No trabalho de Cruz e colaboradores, foi demonstrado que macrófagos infectados contém lipídeos oxidados oriundos do hospedeiro, e que a presença destas moléculas ajudam a inibir a resposta imune inata contra o patógeno, representando um importante fator de virulência para o microrganismo (CRUZ *et al.*, 2008). Mattos e colaboradores demonstraram mais tarde que os lipídeos acumulados em células de Schwann infectadas por *M. leprae* também são oriundos da célula hospedeira (MATTOS *et al.*, 2011a).

A caracterização da formação das células espumosas na infecção por *M. leprae* ainda é pouco compreendida. Estudos mostraram que a associação de *M. leprae* a macrófagos é mediada pela ligação da bactéria a TLR2 e TLR6, que consequentemente ativa uma cascata de sinalização que culmina na formação dos corpúsculos lipídicos. No entanto essa formação nos macrófagos não é dependente desses receptores, podendo haver vias adicionais envolvidas neste processo (MATTOS *et al.*, 2010). Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstra que em células de Schwann infectadas, os corpúsculos lipídicos são recrutados aos fagossomas contendo a micobactéria através da reorganização do citoesqueleto e tráfico vesicular, a partir da ligação da micobactéria ao TLR6, mas de maneira independente de ligação ao TLR2 (MATTOS *et al.*, 2011b). Adicionalmente, a inibição da formação dos corpúsculos lipídicos nas células infectadas afeta a viabilidade do *M. leprae*, mostrando que o acúmulo lipídico é

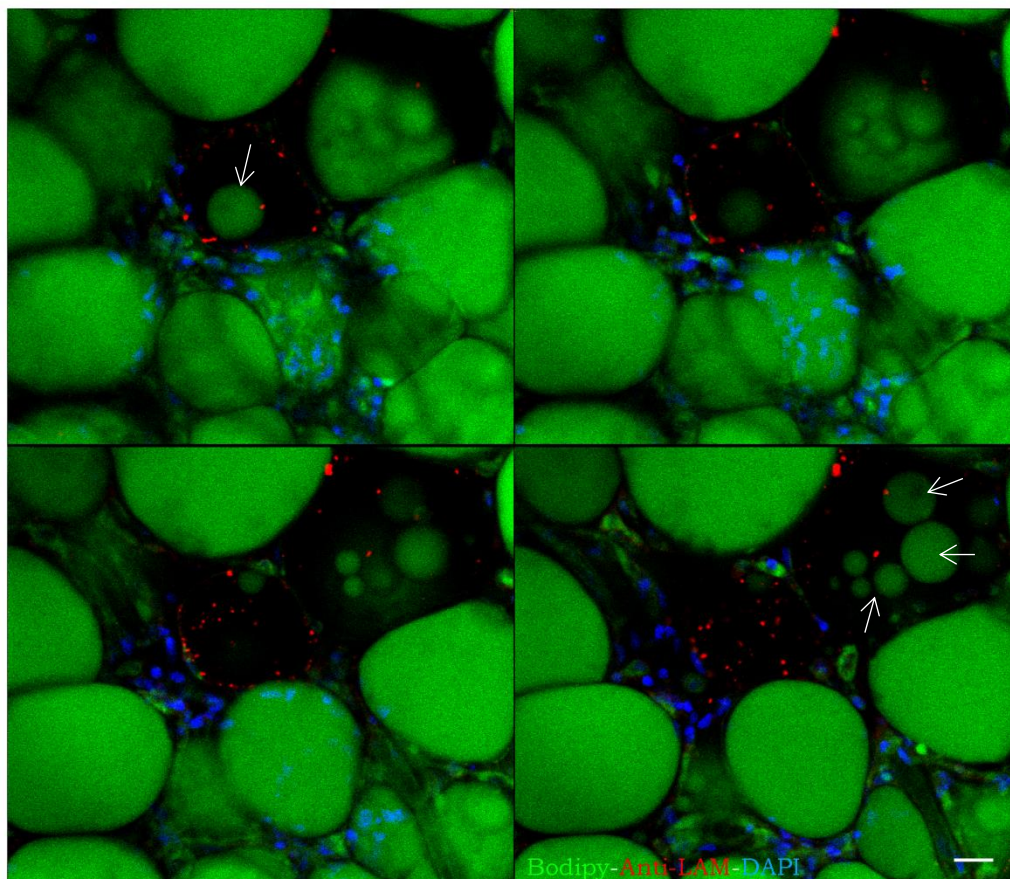
essencial para sobrevivência da micobactéria no hospedeiro (MATTOS *et al.*, 2010; MATTOS *et al.*, 2011a; MATTOS *et al.*, 2012).

A modulação lipídica na infecção por *M. leprae* também tem implicações no perfil inflamatório das células infectadas. As investigações mostram que células infectadas pelo *M. leprae* secretam níveis aumentados da citocina anti-inflamatória IL-10 e níveis reduzidos de IL-12 e de óxido nítrico. Quando há indução da inibição da formação dos corpúsculos lipídicos, ocorre mudança de um perfil anti-inflamatório para o perfil pró-inflamatório, indicando que o acúmulo lipídico também se demonstra uma estratégia de adaptação do bacilo contra a resposta imune na célula hospedeira (MATTOS *et al.*, 2011a; MATTOS *et al.*, 2012). Além disso, macrófagos e células de Schwann infectadas por *M. leprae* apresentam abundante produção de prostaglandina E2, eicosanoide imunomodulador que inibe funções microbicidas e também induz a produção da citocina imunossupressora IL-10 (MATTOS *et al.*, 2010, MATTOS *et al.*, 2011a).

O acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol, fosfolipídeos oxidados e lipídeos neutros, como o triacilglicerol, já foram caracterizados como constituintes dos corpúsculos lipídicos das células infectadas por *M. leprae* (KURUP; MAHADEVAN, 1982; CRUZ *et al.*, 2008; MATTOS *et al.*, 2011a; MATTOS *et al.*, 2014). No entanto, apesar do acúmulo de colesterol ter se mostrado fundamental para sobrevivência do patógeno (LOBATO *et al.*, 2014; MATTOS *et al.*, 2014), o *M. leprae* não utiliza esta molécula como fonte nutricional (MARQUES *et al.*, 2015). Todas as evidências confirmam a importância dos lipídeos para a sobrevivência da micobactéria, que possui genes funcionais que a permite utilizar lipídeos para a via de  $\beta$ -oxidação. Somente recentemente foi realizado um estudo para construção de uma rede metabólica em escala genômica para o patógeno, a fim de auxiliar na identificação das possíveis fontes metabólicas que o *M. leprae* se utiliza para se manter viável (BORAH *et al.*, 2020). A descrição da modulação lipídica que ocorre na infecção pelo *M. leprae* se demonstra um campo essencial para o entendimento da patogênese e persistência do bacilo na hanseníase.

A investigação sobre o envolvimento dos adipócitos, células especializadas na homeostase lipídica amplamente distribuídos sob a pele, como células hospedeiras para o *M. leprae* e as contribuições do tecido adiposo para o desencadeamento de manifestações clínicas na hanseníase nunca havia sido investigado até nosso grupo de pesquisa dar início a este estudo. Resultados prévios deste projeto de pesquisa (DOS REIS, 2016) apresentam indícios *in vitro* e

*in vivo* sobre a importância da examinação do tecido adiposo como importante contribuinte na imunopatologia da hanseníase, com a apresentação do acesso da micobactéria ao tecido adiposo e evidência de mobilização lipídica nos adipócitos de tecido adiposo subcutâneo de paciente acometido pela forma lepromatosa da doença (figura 1.10).



**Figura 1.10: Presença de antígenos de *Mycobacterium leprae* em fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar.** Microscopia de fluorescência de fragmentos de tecido adiposo subcutâneo. Gotículas lipídicas evidenciadas com Bodipy 493/503 (verde), núcleos das células com DAPI (azul) e antígenos de *M. leprae* evidenciados através do uso de anticorpo anti-LAM (vermelho). Cada imagem representa fatias ópticas registradas por microscopia confocal. Nestas imagens é possível confirmar a presença da micobactéria no tecido adiposo de pacientes, correlacionado sua presença com a mobilização de gotículas lipídicas (setas). Aumento de 40x. Barra de escala representa 10 $\mu$ m. Fonte: Dos Reis (2016).

Neste presente trabalho, prosseguimos com as investigações para melhor caracterização da contribuição dos adipócitos e tecido adiposo durante a infecção por *M. leprae*.

*“Compreender as coisas que nos rodeiam é a melhor preparação para compreender o que há mais além.”*

(Hipátia de Alexandria, filósofa e primeira  
mulher matemática)

## 2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença que ainda representa um problema de saúde pública em diversos países, principalmente na Índia e Brasil, países onde a patologia se mantém em prevalência alta. Apesar de se tratar de uma doença milenar, anos de esforços em pesquisas ainda não foram suficientes para descrever detalhes sobre a sobrevivência de seu agente causador, o *M. leprae*, e como sua relação com o hospedeiro causa reações sistêmicas tão diversas no desenvolvimento da doença.

Sabe-se que o metabolismo lipídico da célula hospedeira é importante para o sucesso da infecção do bacilo em macrófagos e células de Schwann. No entanto, a relação do *M. leprae* com os adipócitos, células especializadas no armazenamento lipídico com importante papel na homeostase lipídica do organismo, nunca havia sido investigado antes. Além de poder fornecer toda a maquinaria e moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico que o patógeno necessitaria para sobreviver, sua relação com as células adiposas ou com o tecido adiposo de maneira geral poderia contribuir para a modulação da resposta imune heterogênea que é observada nos pacientes acometidos pela doença, visto a função endócrina já bem descrita do tecido adiposo.

A associação da infecção da micobactéria ao tecido adiposo poderia explicar outras características da doença ainda não compreendidas, como o longo tempo de incubação do bacilo até o aparecimento de manifestações clínicas, que poderia estar abrigado no tecido adiposo de forma a estar menos susceptível ao sistema imune inato do hospedeiro. As falhas terapêuticas e recidivas, muitas vezes envolvendo cepas sensíveis ao tratamento, poderiam ser melhor compreendidas caso a infecção do tecido adiposo confira maior proteção à ação de drogas. A atividade metabólica do tecido adiposo poderia contribuir para o desencadeamento dos casos reacionais, sendo a lipólise uma origem plausível dos antígenos micobacterianos que disparam a reação imune exacerbada, quadro que pode levar à incapacidade irreversível de causa ainda desconhecida.

Este trabalho justifica-se pela investigação inédita da infecção do *M. leprae* aos adipócitos, apresentando o tecido adiposo como importante órgão para sobrevivência e persistência do patógeno, com possível contribuição para a imunopatogênese complexa no desenvolvimento da hanseníase.

### 3. OBJETIVO GERAL

Evidenciar o envolvimento do tecido adiposo na patogenia da hanseníase.

#### 3.1 Objetivos Específicos:

- Investigar os adipócitos como sítio de infecção e persistência do *M. leprae*;
- Descrever a homeostase lipídica de adipócitos infectados por *M. leprae*;
- Verificar alterações no perfil de adipocinas em adipócitos infectados;
- Analisar o ‘*crosstalk*’ entre adipócitos e macrófagos durante a infecção;
- Avaliar o ambiente intracelular dos adipócitos para a viabilidade do *M. leprae*;

*"Aprendi que o caminho do progresso não era rápido nem fácil."*

(Marie Curie, física e química, primeira mulher a ganhar o prêmio Nobel)



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Grupo de Estudo

Foram utilizados fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes diagnosticados como multibacilares, disponibilizadas a partir da coleta de rotina para exame baciloscópico dos pacientes no Ambulatório Souza-Araújo/FIOCRUZ, cedidas pelo Laboratório de Hanseníase – IOC/FIOCRUZ, RJ, sob aprovação do comitê de ética em pesquisa número: 205.047.

Para amostras murinas, camundongos suíços machos com 7-8 semanas de idade foram utilizados para nosso modelo experimental que consistiu em injeção direta de  $10^8$  *M. leprae* em tecido adiposo inguinal. Após 72 horas de infecção, os animais foram eutanasiados, fígado, tecido adiposo e sangue foram coletados para posterior análises metabólicas. O modelo experimental foi feito em colaboração com o Dr. Mauro Sola-Penna e da Me. Thainá Demaria do Laboratório de Enzimologia e Controle do Metabolismo na UFRJ. A utilização dos animais para o estudo esteve sob aprovação do comitê de ética em pesquisa número 088/16.

### 4.2 Obtenção do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* vivo utilizado neste trabalho foi cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, onde a cepa Thai-53 é cultivada no modelo de infecção de coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). Vale reforçar que o *M. leprae* permanece um microrganismo incapaz de se cultivar por longos períodos em meio de cultivo *in vitro*. Após cerca de nove meses da inoculação, os animais são eutanasiados e os coxins plantares são colhidos e enviados ao Laboratório de Microbiologia Celular – IOC/FIOCRUZ, RJ para a etapa de purificação da micobactéria. De modo estéril, as patas são homogeneizadas em meio de cultivo RPMI-1640 (LGC biotecnologia). A suspensão de bacilos é então submetida a digestão enzimática com colagenase e dispase por 2 horas, feita lavagem com água seguido de solução de hidróxido de sódio 0.1 M por 5 minutos, posteriormente ressuspensas utilizando agulha e incubadas a 33° C. Os bacilos são quantificados por contagem direta como descrito por Shepard e McRae (1968) e a viabilidade medida pelo método Live/Dead BacLight, como recomendado pelo fabricante.

### **4.3 Cultura de Células de Linhagem 3T3-L1**

Fibroblastos murinos da linhagem 3T3-L1 foram cultivados em meio DMEM high glucose (Gibco) contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (LGC Biotecnologia) e suplementado com 10% de soro bovino (SB, Cripion) em estufa a 37°C e 5.0% de CO<sub>2</sub>, sendo mantidos em garrafas de culturas em repiques semanais. A partir do plaqueamento, o SB utilizado foi substituído pelo soro fetal bovino (SFB, Cripion) até atingir a confluência (48 horas após plaqueamento) nos poços, dando então início ao protocolo de diferenciação das células adicionando meio de indução de diferenciação contendo 0.5 mM de 3-isobutil-metilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich), 1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 2 µM de rosiglitazona (Sigma-Aldrich) e 0.3 UI/mL de insulina (Humulin). Após 72 horas, o meio de diferenciação foi removido e as culturas foram mantidas com meio de maturação contendo somente 0.3 UI/mL de insulina de aditivo, com troca a cada 48 horas até a diferenciação em adipócitos maduros (após 10 dias de diferenciação), com visível presença de diversos e grandes corpúsculos lipídicos. Para os ensaios de infecção, o *M. leprae* vivo na multiplicidade de infecção (MOI) de 5, 20 ou 50:1 foram adicionados nas culturas de adipócitos com meio DMEM high glucose com 10% de SFB, sem antibiótico, e as mesmas mantidas a 33°C em 5.0% de CO<sub>2</sub> nos diferentes tempos experimentais.

Com o intuito de avaliarmos as enzimas lipolíticas dos adipócitos, foram utilizados adicionalmente nas culturas 20 µM do inibidor de HSL CAY10499 (Cayman) ou 50 µM do inibidor de ATGL Atglistatina (Sigma-Aldrich). Também foram realizados ensaios utilizando 1 µg/mL de rifampicina pelo tempo de 48 horas nas culturas para análises de viabilidade micobacteriana. Adicionalmente, a adição de TNF nas culturas na concentração de 50 ng/mL ou a utilização de isoproterenol a 10 µM foram utilizados como controle positivo de indução de lipólise.

### **4.4 Cultura de células de linhagem Raw 264.7**

Macrófagos murinos de linhagem Raw 264.7 foram mantidos em meio DMEM high glucose (Gibco) suplementado com 10% de SFB (Cripion) em estufa a 37°C e 5.0% de CO<sub>2</sub>. Após plaqueamento, as culturas foram infectadas com *M. leprae* vivo na MOI de 50:1 e mantidas a 33°C em 5.0% de CO<sub>2</sub>. Igualmente, as culturas posteriormente receberam 1 µg/mL de rifampicina por 48 horas para os ensaios de análise de viabilidade micobacteriana.

Adicionalmente, o volume total dos sobrenadantes das culturas dos adipócitos foram adicionados nas culturas de macrófagos pelo tempo de 48 horas para avaliação do impacto do meio condicionado dos adipócitos na viabilidade micobacteriana nos macrófagos, bem como o estímulo da expressão gênica de genes marcadores de estresse oxidativo e citocinas inflamatórias nestas células.

#### **4.5 Extração e purificação de ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos totais das culturas celulares foram extraídos utilizando o reagente Trizol (Life technologies) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os tempos experimentais, o sobrenadante das culturas foi coletado, e então adicionado 500  $\mu$ L de Trizol nos poços para lise das células aderentes. O conteúdo lisado foi submetido a etapas subsequentes de extração. Ao conteúdo em trizol foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Merck) e os tubos foram homogeneizados por inversão e então centrifugados a 12.000  $\times$ g a 4° C por 15 min. A fase aquosa contendo RNA (fase superior, aproximadamente 200  $\mu$ L) foi transferida para novos tubos RNase Free e adicionados 200  $\mu$ L de etanol 70% (Merck), misturado por inversão e o conteúdo adicionado nos tubos *Spin Cartridge* para as etapas subsequentes utilizando kit PureLink RNA Mini, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante para purificação do RNA, que ao final foi eluído em água.

As fases intermediária e orgânica restantes foram posteriormente submetidas a extração de DNA. Foi adicionado aos tubos 100  $\mu$ L de solução de Tris-EDTA (5 mM Tris; 0.1 mM EDTA, pH 8.0) e 150  $\mu$ L de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação a 12.000 $\times$ g por 10 minutos em temperatura ambiente, a fase aquosa sobrenadante contendo o DNA foi transferido para tubos RNase Free, e adicionados o dobro do volume coletado de isopropanol. As amostras foram incubadas *overnight* a -20° C para precipitação do DNA. A segunda etapa realizada para purificação DNA consistiu em centrifugação do material por 30 minutos a 4° C e posteriormente a adição de 250  $\mu$ L etanol 70% e novamente a centrifugação a 12.000 $\times$ g por 15 minutos. Após a última centrifugação, o pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água. As amostras purificadas de DNA foram armazenadas a -20° C e as de RNA em freezer -70° C até sua utilização para as etapas seguintes. A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop ND-1000

(Thermo Scientific). As etapas posteriores a extração e purificação de RNA consistiram na transcrição reversa do RNA para cDNA conforme instruções do fabricante.

#### **4.6 Síntese de cDNA – RT-PCR**

O cDNA foi obtido a partir do RNA purificado das culturas celulares mediante o uso do kit *GoScript Reverse Transcription Mix* (Promega) em uma reação com volume final de 20 µL. Foi utilizada a concentração de 200 a 2000 ng de RNA junto a *Random primers* e enzima transcriptase reversa ao mix do produto, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Essa mistura foi incubada a 25° C por 5 minutos para anelamento dos primers, seguido por 1 hora a 42° C para transcrição e depois incubação a 70° C por 15 minutos para inativação da enzima. Após o término da reação, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20° C até sua utilização na técnica de qPCR.

#### **4.7 PCR em tempo real para determinação da viabilidade micobacteriana e análise de expressão gênica**

Para estimar a viabilidade do *M. leprae* no ambiente intracelular foi utilizado o sistema de PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo como descrito por Martinez e colaboradores (2009), com algumas modificações. As amostras de cDNA e DNA oriundas das culturas celulares infectadas por *M. leprae* foram utilizadas na reação na concentração de 10ng e 20ng, respectivamente, utilizando o sistema de reação *TaqMan*, com o kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. As reações foram incubadas a 50° C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos do estágio de PCR a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

Para analisar a expressão gênica de alvos celulares ou genes micobacterianos, foi utilizado o sistema Power SYBR Green (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra foram amplificados cDNA na concentração de 10ng na reação a partir de primers específicos para diversos genes (tabela 4.1) e as reações foram executadas no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems), com a utilização dos ciclos de 95° C por 10 minutos na etapa inicial, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos, 55° C

por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, finalizando com a etapa de análise da curva de *Melting*.

#### 4.8 Análise dos dados obtidos a partir do PCR em tempo real

Para o cálculo de análise dos dados de viabilidade micobacteriana, os níveis de RNAr 16S foram normalizados pelos seus níveis de DNA. Já para a análise dos alvos de expressão gênica nos adipócitos, os valores de cDNA foram normalizados pelos valores obtidos na reação do gene de referência GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Por sua vez, para os alvos micobacterianos foi utilizado como gene de referência os níveis de RNAr 16S.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Inicialmente foi calculado o  $\Delta Ct$ , subtraindo-se os valores de Ct (limiar do ciclo) do gene alvo dos valores de Ct do gene de referência. Para se calcular o  $\Delta\Delta Ct$  foi utilizada a fórmula: [ $\Delta Ct$  (amostra) -  $\Delta Ct$  (amostra normalizadora)]. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Tabela 4.1: Sequências dos *primers***

<b>Alvo</b>	<b>Senso / Antissenso</b>
<b>ABCA1</b>	GGACATGCACAAGGTCCTGA CAGAAAATCCTGGAGCTTCAAA
<b>ABCG1</b>	GTGGATGAGGTTGAGACAGACC CCTCGGGTACAGAGTAGGAAAG
<b>Adiponectina</b>	GTTCTACTGCAACATTCCGG TAACCTGGAGCCAGACTTG
<b>ADRP</b>	GAATTTCTGGTTGGCACTGT GACCATTTCTCAGCTCCACTC
<b>AMPK alpha 1</b>	GCCATGCGCAGACTCAGTTC GCCACCTTCACTTTCCCGA
<b>ATGL</b>	GGTGCCAACATTATTGAGGTG AAACACGAGTCAGGGAGATGC
<b>GAPDH</b>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG ACACATTGGGGGTAGGAACA
<b>HIF-1 alpha</b>	CAAGATCTCGGCGAAGCAA GGTGAGCCTCATAACAGAAGCTTT

<b>HSL</b>	TCGGGGAGCACTACAAACG CACGCAACTCTGGGTCTATGG
<b>IL-6</b>	CCGGAGAGGAGACTTCACAG GGAAATTGGGGTAGGAAGGA
<b>IL-10</b>	GTGTGTATTGAGTCTGCTGGAC GGAACTGAGGTATCAGAGGTA
<b>iNOS</b>	CACCTTGGAGTTCACCCAGT ACCACTCGTACTTGGGATGC
<b>Kc (CXCL1)</b>	AGTAGAAGGGTGTGTGCGA CGTGCGTGTGACCATACAA
<b>Leptina</b>	GAGACCCCTGTGTCGGTTC CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG
<b>MCP-1</b>	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
<b>Perilipina</b>	GTCCCTATCCGATGCCCTGAAG CGCTCCGCCTCTGCTGAAG
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	GGAAGCCCTTTGGTGACTTTATGG GCAGCAGGTTGTCTTGGATGTC
<b>Receptor Adrenérgico beta 1</b>	GCGAGCTCTGGACTTCGGTA TCTGGTAGCGAAAGGGCGAC
<b>TNF</b>	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC
<b>tgs2 / ML1244</b>	GGGCAATTCTACGACCTGCT GCCTGGCTCAACACTCTGAT
<b>fadE25 / ML0737</b>	TAATTGTCTACGCTGCCGCT GACGCCGCTGAAATAAAGCC
<b>PPE / ML1828c</b>	ACAGCGGTAGAATCATCGGG TCGCTTCGGGTAATCCTGTG

#### 4.9 Microscopia de Fluorescência

No experimento utilizando culturas de adipócitos, foram utilizadas  $2 \times 10^4$  células por poço de placas de 24 poços (Corning) contendo lamínulas, onde, após confluência da cultura, as células foram diferenciadas e os adipócitos infectados com *M. leprae* na MOI de 20:1 marcados previamente com o fluoróforo PKH67 (verde) (Sigma-Aldrich). Ao final dos ensaios de infecção, o meio de cultura foi coletado e as culturas lavadas com PBS 1X (LGC Biotecnologia) e então fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos à temperatura ambiente para protocolo de marcação com Oil Red O (Sigma-Aldrich), para detecção dos corpúsculos

lipídicos. Neste protocolo de marcação, foi adicionado 200 µL de solução de Propileno Glicol a 100% por 5 minutos em temperatura ambiente, depois descartado. Em seguida, adicionado 200 µL da solução de Oil Red O por 7 minutos e removido. Na última etapa, foi feita adição de 200 µL da solução de Propileno Glicol 85% durante 3 minutos e descartado. Posteriormente, foi feita marcação dos núcleos com DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich) por 5 minutos e lavagem com PBS 1X (LGC Biotecnologia) para retirada do excesso dos corantes. Após todo procedimento de marcação, as culturas em lamínulas foram montadas em lâminas de vidro contendo solução de ProLong Gold Antifade (Life Technologies) e seladas com Entellan (Merck) para visualização no microscópio.

As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer com sistema de iluminação Colibri (Zeiss) e registradas em câmera monocromática HMR (Zeiss). A quantificação dos corpúsculos lipídicos das culturas foi mensurada utilizando o software ImageJ, onde os corpúsculos lipídicos corados em vermelho por OilRed foram destacados manualmente para mensuração da área de cada corpúsculo analisado nas imagens, sendo divididos em corpúsculos pequenos ( $\leq 5\mu\text{m}^2$ ), médios (de 5 a 15  $\mu\text{m}^2$ ) e grandes ( $\geq 15\mu\text{m}^2$ ). As imagens adquiridas foram editadas utilizando o software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems).

#### **4.10 Imunofluorescência**

Fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes com Hanseníase multibacilar foram coletados e cedidos pelo Ambulatório Souza-Araújo (FIOCRUZ), e fixados em paraformaldeído 4%. O tecido foi cortado em pedaços pequenos, com aproximadamente 1 cm e emblocados em ágar para cortes de espessura de 150 µm utilizando o aparelho micrótomo de navalha vibratória VT1000 S (Vibratome – Leica BioSystems). Os cortes foram adicionados em lâminas para seguir com o protocolo de imunomarcação, onde foi feita a primeira etapa com bloqueio de 30 minutos em solução tampão de marcação intracelular contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA) diluída em PBS pH 7,4 e 0,1% de saponina, a temperatura ambiente. Após esta etapa, foi adicionado o anticorpo primário contra a micobactéria anti-lipoarabinomanana (LAM) CS-35, gentilmente cedido pelo Repositório de Recursos em Pesquisa de Biodefesa e Infecções Emergentes (<http://www.beiresources.org>) mais solução de anticorpo primário contra macrófagos anti-CD68 (Abcam) e incubados overnight a 4° C. Após

incubação com anticorpos primários, foram realizadas três lavagens por 10 minutos, com a solução tampão. Para incubação dos anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor 594 IgG anti-mouse e Alexa Fluor 488 IgG anti-rabbit (Life Technologies) por 1 hora a temperatura ambiente, seguida de lavagem e incubação com DAPI (Invitrogen) por 10 minutos para marcação dos núcleos celulares. Após processamento das amostras, fatias óticas foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer com sistema ApoTome e iluminação Colibri (Zeiss) em aumento de 63x. As imagens foram processadas e editadas utilizando o Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems).

#### 4.11 Incorporação de lipídeos radioativos

Em colaboração com a Dra. Geórgia Atella e da Lic. Karoline Lima do Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas na UFRJ, foram feitos ensaios utilizando lipídeos tritiados [<sup>3</sup>H]. As culturas de adipócitos foram incubadas pelo tempo de 24 horas com 0.03 µCi de [<sup>3</sup>H]Colesterol-HDL para incorporação de colesterol radioativo ou com 5 µCi de [<sup>3</sup>H]Palmitato-BSA para incorporação de ácido graxo radioativo e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incorporação intracelular dos lipídeos radioativos, o sobrenadante celular foi removido, as culturas lavadas com PBS para remoção de radioatividade não incorporada pelas células e foi seguido o experimento de infecção com o *M. leprae*. O sobrenadante das culturas e o lisado foram coletados e submetidos a extração lipídica seguindo o método descrito por Bligh & Dyer (1959). Após extração, as amostras foram secas utilizando nitrogênio gasoso e ressuspensas em 50 µL para aplicação em placas para separação por cromatografia de camada fina (TLC), de onde foi feita coleta dos lipídeos por raspagem da sílica e adicionados em coquetel de contagem de cintilação *Optima Gold Plus* (Perkin Elmer) para mensuração da radioatividade por cintilador Beckman LS 600 (Beckman Coulter) e expressa em DPM (*Disintegrations Per Minute*). Os resultados de sinal das moléculas radioativas foram expressos a partir do cálculo:

$$\% \text{Radioatividade extracelular} = 100 \times \frac{\text{DPM do sobrenadante}}{\text{DPM do lisado celular} + \text{DPM do sobrenadante}} .$$



#### 4.12 Imunoblotting

Os ensaios de imunoblotting foram realizados em colaboração com a Dra. Jyothi Nagajyothi durante as atividades do período de doutorado sanduíche em seu laboratório no Public Health Research Institute – PHRI, da universidade Rutgers (EUA).

Para extração das proteínas, as culturas das células cultivadas em placas de 6 poços foram lavadas com PBS 1X para remoção do conteúdo do sobrenadante e lise celular. Após lavagem, foi adicionado 600 µL de PBS 1X para remoção das células aderentes utilizando raspador de células. O conteúdo celular foi então centrifugado a 14.000 xg por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi removido e então adicionado 150 µL de tampão RIPA (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% triton X-100, 2 mM EDTA, 1% deoxicolato de sódio, Tris-HCl pH 7.5) para lise do *pellet* celular e então centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4° C e coletado o sobrenadante do material contendo as proteínas extraídas.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método colorimétrico *Pierce BCA protein assay* (Thermo scientific) segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente as amostras foram diluídas 10x, e então foram misturadas 20 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com 1 parte do reagente B (sulfato de cobre 4%). Em microtubos, foram adicionados 20 µL da mistura dos reagentes A e B e preparada a curva padrão do método, o “branco” (PBS) e a adição de 1µL das amostras, seguido por incubação a 37° C por 30 minutos. A leitura do material foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific).

Após as dosagens, 10 µg das proteínas extraídas foram diluídas em tampão de amostra 6x concentrado (10 mL contendo 1.2 mL de Tris pH 6.8 a 0.5 M; 4.7mL de Glicerol; 1.2 g de SDS; 0.5 mL de β-Mercaptoetanol, 6 mg de azul de bromofenol, completado com água deionizada) e fervidas por 5 minutos. As amostras e a solução padrão de peso molecular (Bio Rad) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) composto por um gel de empilhamento a 4% (solução de acrilamida a 40%, 0.5M de Tris-HCl pH 6.8, 10% de SDS, persulfato de amônio a 10% e solução de TEMED avolumados em água deionizada) e um gel de separação a 10% (solução de acrilamida 40%, 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 10% de SDS, persulfato de amônio a 10% e solução de TEMED avolumados em água deionizada). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1% de SDS - BioRad), sob voltagem constante de 100V em cuba de eletroforese (Bio Rad).

O gel contendo as proteínas que migraram durante a eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando sistema de transferência (Bio-Rad) em corrente constante de 100V por 1 hora em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, metanol 20% - BioRad). Para conferir a devida transferência das proteínas para as membranas, estas foram então coradas com solução de Ponceau S (BioRad) e descoradas por lavagens com água deionizada e solução de TBS-T (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20).

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS-T com 5% de leite desnatado ou solução de TBS-T com 5% de BSA (Sigma-Aldrich) (para análise de proteínas fosforiladas) por 1 hora em agitação e incubadas overnight a 4° C com solução de anticorpo primário (Tabela 4.2) diluídos em TBS-T com 5% de BSA. Após incubação com o anticorpo, as membranas foram lavadas por três vezes com TBS-T durante 5 minutos em agitação e em seguida incubadas por 1 hora em agitação com anticorpo secundário (Tabela 4.2) diluído em TBS-T com 5% de BSA. Após incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 5 minutos e então adicionada solução de substrato quimioluminescente Clarity Western ECL Substrate (BioRad) para detecção das bandas específicas utilizando o sistema de imagem ChemiDoc (BioRad), com a exposição da membrana de nitrocelulose por diferentes tempos de exposição até a revelação das bandas do sinal da proteína de interesse.

As análises de densitometria das bandas das proteínas foram realizadas utilizando o software *Image Studio Lite Ver 5.2* (LI-COR Biosciences) e os resultados foram gerados a partir da relação entre os valores de densitometria das bandas das proteínas de interesse pelos níveis da proteína normalizadora GDI (*guanosine nucleotide dissociation inhibitor*).

**Tabela 4.2: Lista de Anticorpos**

<b>Primários</b>	
Anti-Adiponectin Mouse mAb [19F1]	Abcam
Anti-AMPK alpha-1 Mouse mAb (2B7)	Invitrogen
Anti-Phospho-AMPK alpha-1 (Ser485) (45F5) Rabbit mAB	Cell Signaling
Anti-GDI1 Rabbit pAb – 71-0300	Invitrogen
Anti-ATGL (30A4) Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-HSL (D6WSS) XP Rabbit mAb	Cell Signaling

Anti-Phospho-HSL (Ser563) Rabbit pAb	Cell Signaling
Anti-Beta1-Adrenergic Receptor Rabbit pAb	Cell Signaling
Anti-Adipose Triglyceride Lipase (phospho S406) Rabbit pAb	Abcam
Anti-Perilipin-1 (D1D8) XP Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-Phospho-Perilipin 1 ser522 Mouse mAb	Vala Sciences
PPAR gamma (C26H12) Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-PPAR alpha (3B6/PPAR) Mouse mAb	Invitrogen
Anti-ADIPOR1 (Adiponectin receptor 1) Rabbit pAb	Abcam
Anti-Adiponectin receptor 2/ ADIPOR2 Rabbit pAb	Abcam
Anti-lipoarabinomanana (LAM) CS-35	BeiResources
Anti-CD-68 ab125212 Rabbit pAb	Abcam
<b>Secundários</b>	
Goat Anti-Mouse IgG HRP pAb	Invitrogen
Goat Anti-Rabbit IgG HRP pAb	Invitrogen
Alexa Fluor 594 Anti-Mouse IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit IgG	Invitrogen

### 4.13 Análises metabólicas

Os níveis das moléculas de glicose, Colesterol, HDL, LDL e TAG foram mensurados no soro dos camundongos coletados após injeção de salina (controles não infectados) ou de *M. leprae* no tecido adiposo inguinal, utilizando kits comerciais: Glicose Bioliquid (Laborclin), Colesterol Enzimático Líquido (Doles), Colesterol HDL (Doles), LDL Direto (Bioclin) e Triacilglicerídeos monoreagente (Bioclin), seguindo as instruções do fabricante.

Os níveis de TAG no fígado dos animais foi feita após extração lipídica hepática de 50mg dos órgãos homogeneizados em isopropanol, seguida da mensuração de triacilglicerol utilizando kit comercial Triacilglicerídeos monoreagente (Bioclin). Os níveis de TAG hepático mensurados foram normalizados pelo peso total do órgão do animal.

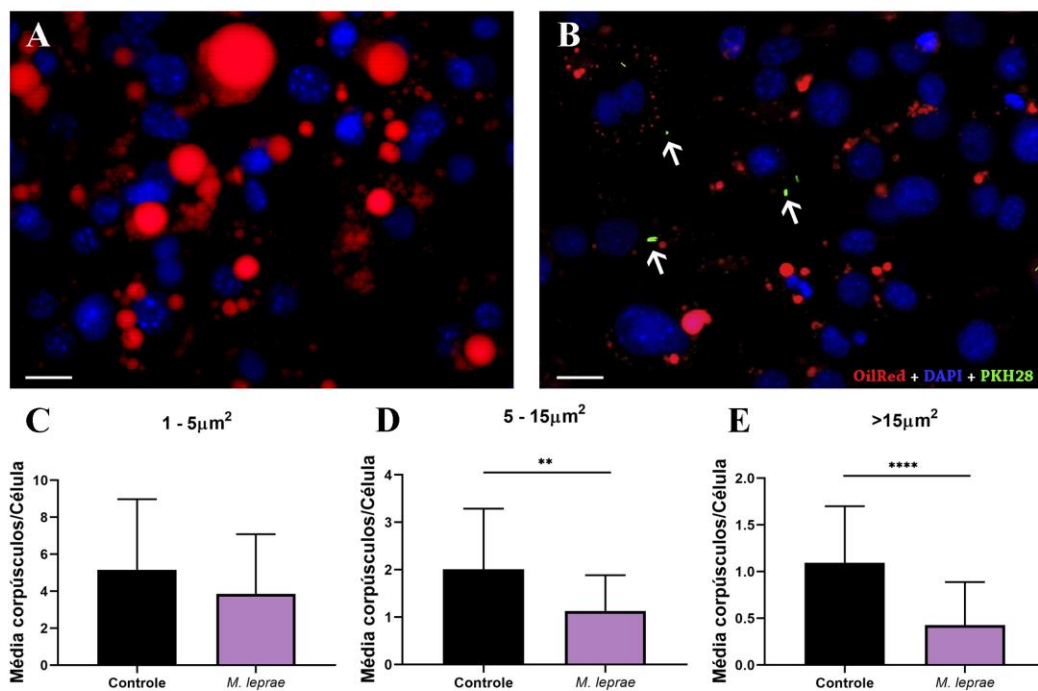
*“A ciência, para mim, dá uma explicação parcial para a vida. Na medida em que vai, é baseada em fatos, experiências e experimentos.”*

(Rosalind Franklin, química e biofísica)

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Modulação lipídica em adipócitos infectados por *Mycobacterium leprae*

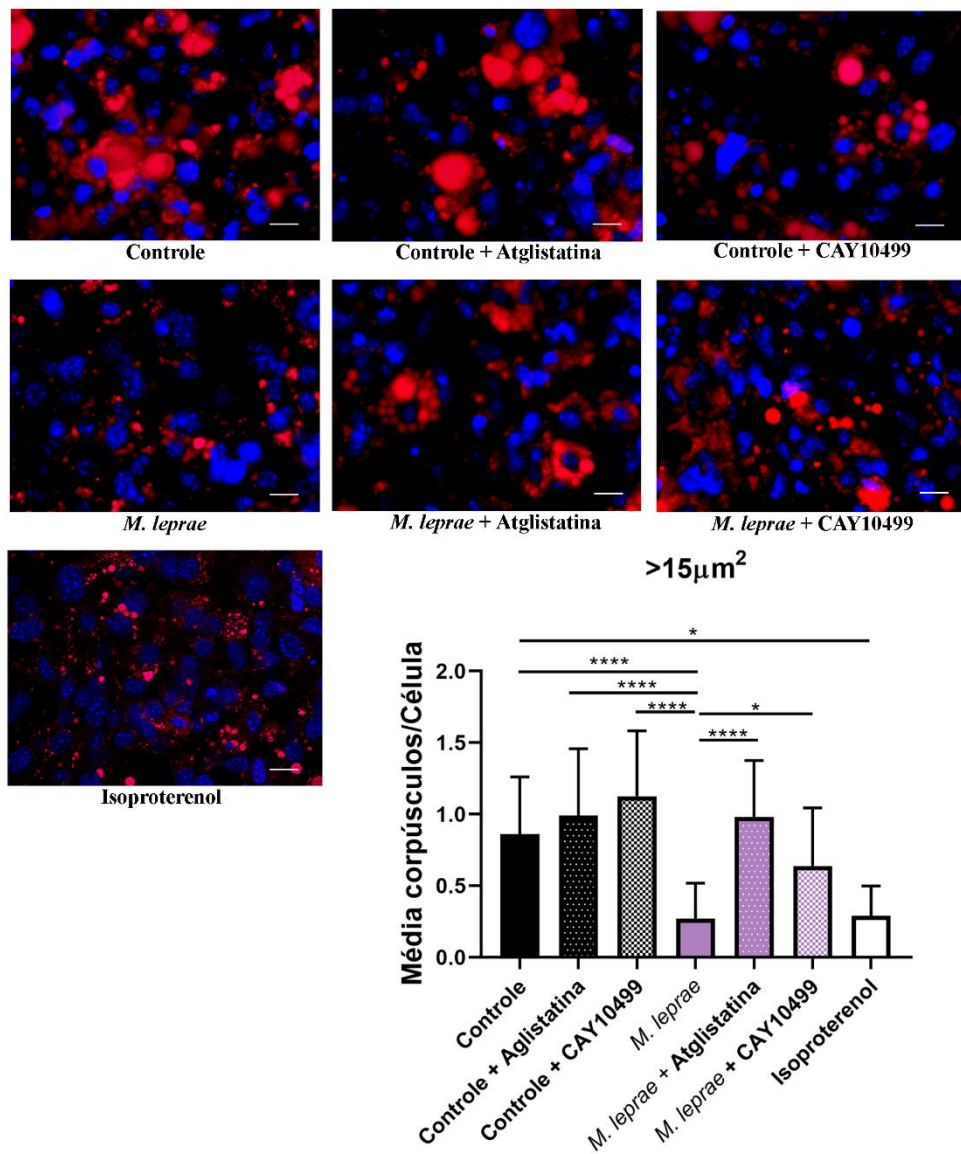
Dados prévios apresentados na dissertação de mestrado deste mesmo projeto (DOS REIS, 2016) demonstraram a modulação lipídica no modelo de infecção de *M. leprae* em adipócitos *in vitro*, com notável redução dos corpúsculos lipídicos nas culturas infectadas. A partir dessa evidência, culturas de adipócitos infectadas ou não com *M. leprae* na multiplicidade de infecção de 5 bactérias por célula (MOI 5:1) pelo tempo de 24 horas de infecção foram processadas para as análises por microscopia de fluorescência e quantificação da área dos corpúsculos lipídicos presentes nos campos registrados (Figura 5.1).



**Figura 5.1: Quantificação de corpúsculos lipídicos.** Microscopia de fluorescência de cultura de células 3T3-L1 controle (A) e infectada com *M. leprae* por 24 horas (B) evidenciando os corpúsculos lipídicos corados por OilRed O (vermelho), núcleos contrastados por DAPI (azul) e *M. leprae* corados por PKH28 (verde - setas) (MOI 5:1). Gráficos representam a quantificação de corpúsculos lipídicos pequenos, com área de 1 a 5 μm<sup>2</sup> (C), médios, de 5 a 15 μm<sup>2</sup> (D) e grandes, maiores de 15 μm<sup>2</sup> (E) utilizando o software ImageJ. Os valores representam a média ± desvio padrão. Barra de escala representa 20 μm. Resultado representativo de diversas imagens analisadas de cinco (C e D) e sete (E) experimentos independentes. \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001, teste Mann-Whitney.

Com a confirmação de que a infecção pelo bacilo leva à diminuição do conteúdo lipídico nos adipócitos, o passo seguinte foi investigar a ocorrência do processo de lipólise nestas

células. O conteúdo de triacilglicerídeos (TAG) dos adipócitos é hidrolisado à ácidos graxos e glicerol com a participação de três enzimas: lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), a lipase hormônio sensível (HSL) e a monoacilglicerol lipase (MAG). Com isso, foram adicionados às culturas celulares drogas inibidoras da ação da enzima ATGL (Atglistatina – Sigma) ou da enzima HSL (CAY10499 – Cayman) a fim de se analisar o bloqueio da indução de lipólise durante a infecção por *M. leprae*. Os dados da quantificação de corpúsculos lipídicos grandes (maiores que  $15\mu\text{m}^2$ ) após a exposição às drogas são apresentados na figura 5.2.



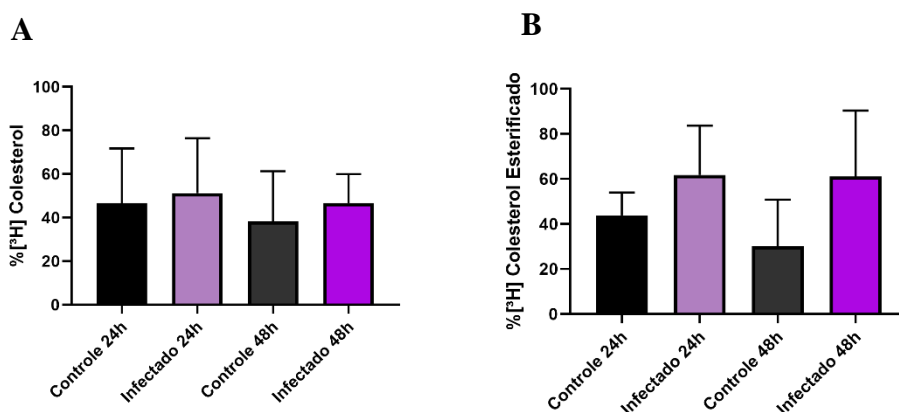
**Figura 5.2:** Investigação da atividade de enzimas lipolíticas em culturas infectadas por *Mycobacterium leprae*. Imagens representativas das culturas de adipócitos nas diferentes condições experimentais, com corpúsculos evidenciados pela marcação com Oil red O e núcleos com DAPI. As culturas com adição das drogas foram tratadas previamente por 2 horas antes da infecção por *M. leprae* pelo tempo de 24 horas. Gráfico representa a quantificação de corpúsculos lipídicos grandes ( $>15\mu\text{m}^2$ ) em culturas não infectadas (controle) ou infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1), com adição de  $50\mu\text{M}$  de atglistatina (Sigma) ou  $20\mu\text{M}$  de CAY10499 (Cayman), e  $10\mu\text{M}$  de isoproterenol (controle positivo de indução de lipólise). Análise feita utilizando o software ImageJ a

partir de diversas imagens de três experimentos independentes. Barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . Os valores representam a média  $\pm$ desvio padrão. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Os dados indicam que, com o bloqueio das enzimas responsáveis pela degradação do conteúdo lipídico dos adipócitos consequentemente bloqueando o processo de lipólise, o efeito de redução de corpúsculos induzido pela infecção pelo *M. leprae* é revertido. No entanto, aparentemente a enzima ATGL está mais envolvida neste processo de indução de lipólise do que a enzima HSL, pois há uma maior reversão do processo de lipólise quando esta enzima é bloqueada com o pré-tratamento com a droga Atglistatina comparado ao efeito utilizando a droga CAY10499 nas culturas infectadas.

Os corpúsculos lipídicos dos adipócitos são compostos por um núcleo com TAG e colesterol, circundados por uma monocamada fosfolipídica revestida de proteínas. Estudos demonstram que apesar de seu conteúdo principal ser constituído por TAG, os adipócitos também representam um vasto reservatório de colesterol, em sua forma livre e esterificada (KRAUSE & HARTMAN, 1984). Dando sequência a investigação da modulação lipídica induzida pela infecção do bacilo nos adipócitos, foram feitas análises das biomoléculas lipídicas envolvidas neste processo.

Para analisar o conteúdo de colesterol nas culturas, as culturas foram incubadas com  $[^3\text{H}]$ Colesterol-HDL para incorporação pelas células no tempo de 24 horas, seguido de infecção ou não com *M. leprae* pelos tempos experimentais. O conteúdo do sobrenadante e lisado das células foram submetidos à extração lipídica para a separação por TLC e análise das moléculas de colesterol radioativos em sua forma livre e esterificada. Na figura 5.3 é representado o efluxo destas moléculas pelas células controles e infectadas pelo *M. leprae*.

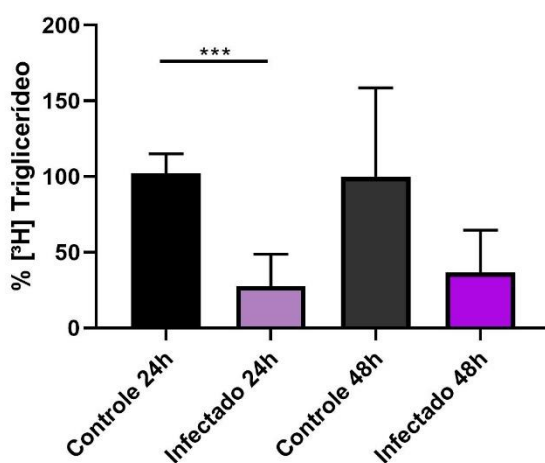


**Figura 5.3: Análise do efluxo de colesterol radioativo extracelular.** Análise de colesterol (A) e colesterol esterificado (B) a partir de lisados celulares e sobrenadantes de culturas de adipócitos previamente incubadas por 24 horas com  $0,03\mu\text{Ci}$  de  $[^3\text{H}]$ Colesterol-HDL para incorporação de colesterol radioativo. Após esse período, as culturas foram infectadas ou não por *M. leprae* (MOI 5:1) e mantidas pelo tempo experimental de 24 e 48 horas.

Dados representam dois (24 horas) e um (48 horas) experimento independente feito em triplicata e apresentado em porcentagem do conteúdo de [<sup>3</sup>H]Ácidos graxos nos sobrenadantes. Gráfico representa média ±desvio padrão. Teste t não pareado; Efluxo de colesterol 48 horas realizado teste Mann-Whitney. Diferenças não significativas.

Neste dado, podemos inferir que após o adipócito incorporar o [<sup>3</sup>H]Colesterol ofertado complexado à molécula de HDL, a molécula tanto em sua forma livre, mas principalmente de forma esterificada, se apresenta com maior efluxo para o sobrenadante celular quando as culturas estão infectadas pela micobactéria. No entanto mais replicatas e análises por este método se fazem necessárias para confirmar esta observação.

Além disso, foi feita a investigação do conteúdo de triglicerídeo intracelular após incorporação das moléculas de ácidos graxos radioativos ofertado como [<sup>3</sup>H]Palmitato-BSA, onde foi possível confirmar a modulação do conteúdo lipídico com significativa redução de triacilglicerídeos quando as culturas são infectadas com *M. leprae* (figura 5.4), corroborando com os dados anteriores obtidos pela quantificação de corpúsculos através da microscopia de fluorescência.

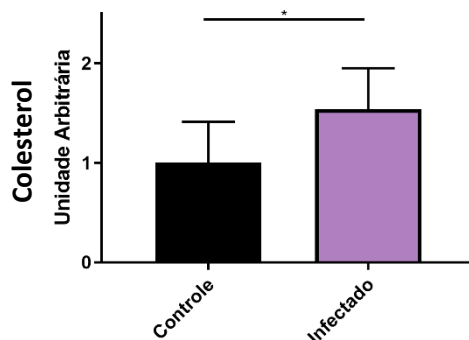


**Figura 5.4: Análise do conteúdo de triacilglicerol intracelular.** Análise dos lisados de culturas de adipócitos incubadas com 5 $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]Palmitato-BSA para incorporação por 24 horas, infectadas ou não por *M. leprae* (MOI 5:1) por 24 ou 48 horas. Os dados representam a porcentagem de triacilglicerol formado pela célula a partir da incorporação de ácidos graxos radioativos presente nas culturas infectadas em relação ao conteúdo das culturas controle não infectadas. Dados representam dois (24 horas) e um (48 horas) experimento independente feito em duplicata. Gráfico representa média ±desvio padrão. \*\*\*p<0.001, Teste t não pareado.

Além da análise de efluxo de colesterol radioativo, os sobrenadantes celulares foram utilizados para dosagem por kit comercial para a mensuração de colesterol total. Neste dado, é confirmado que as culturas de células infectadas apresentam maior efluxo de colesterol para o



meio extracelular quando comparadas aos seus níveis no sobrenadante das células controle não estimuladas (figura 5.5).

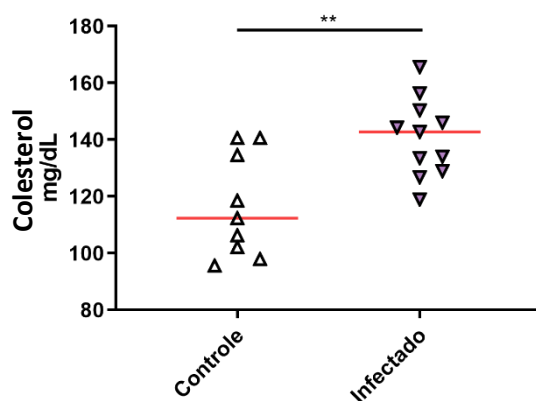


**Figura 5.5: Dosagem de colesterol total em sobrenadante celular.** Amostras de sobrenadantes de culturas de adipócitos infectados ou não por *M. leprae* (MOI 5:1) por 24 horas foram utilizadas para dosagem de colesterol total (kit Bioclin). Dados expressos em relação ao controle em três experimentos independentes. Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$ , teste t não pareado.

Análises do efluxo de ácidos graxos radioativos a partir da incorporação de [ $^3\text{H}$ ]Palmitato-BSA foram feitas, assim como a dosagem do efluxo de glicerol nos sobrenadantes celulares mensurada utilizando kit de detecção de glicerol (ZenBio), no entanto não foram apresentadas diferenças significantes entre as amostras analisadas (dados não apresentados).

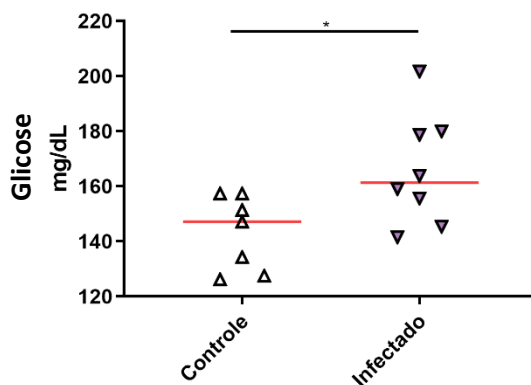
## 5.2 Análises metabólicas em modelo *in vivo* de injeção de *Mycobacterium leprae* em tecido adiposo inguinal

O efluxo de colesterol durante a infecção também foi observado em nosso modelo *in vivo*. Camundongos foram utilizados em nosso modelo experimental de injeção direta de *M. leprae* no tecido adiposo inguinal pelo tempo de 72 horas de infecção para as análises metabólicas induzidas após infecção pelo bacilo. A dosagem de colesterol total feita por kit comercial (Bioclin) em amostras de soro dos animais demonstram maior disponibilidade de colesterol total nos animais que receberam injeção de *M. leprae* no tecido adiposo (figura 5.6).



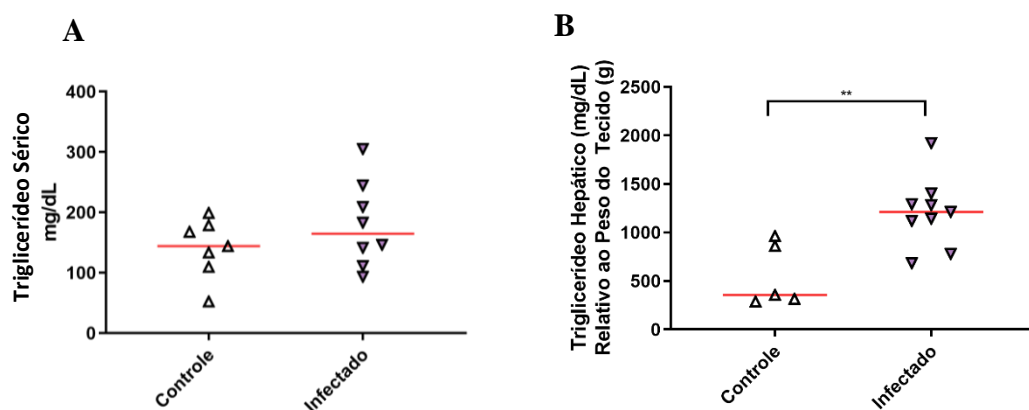
**Figura 5.6: Dosagem dos níveis séricos de colesterol total.** Após 72 horas da injeção direta de PBS (controle) ou  $10^8$  *M. leprae* no tecido adiposo inguinal de camundongos, foi feita coleta de sangue para obtenção do soro para as análises. Gráfico representa mediana dos valores obtidos da dosagem de cada animal.  $**p < 0.01$ , teste t não pareado.

Adicionalmente, os níveis de glicose dos animais infectados se apresentaram também alterados em relação aos controles, demonstrando uma maior disponibilidade desta molécula em seus níveis séricos neste grupo (figura 5.7).



**Figura 5.7: Dosagem dos níveis séricos de glicose.** Análise dos níveis de glicose em soro de animais após 72 horas da injeção direta de PBS (controle) ou  $10^8$  *M. leprae* no tecido adiposo inguinal. Gráfico representa mediana dos valores obtidos da dosagem de cada animal.  $*p < 0.05$ , teste t não pareado.

A dosagem de triacilglicerídeos também foi mensurada nos animais. Os níveis séricos do conteúdo de triacilglicerídeos entre os dois grupos experimentais não apresentaram diferença significativa (figura 5.8A). No entanto, as dosagens dos níveis hepáticos de triacilglicerídeos nestes animais se apresentaram significativamente maiores no grupo de animais infectados comparados aos níveis do grupo controle (figura 5.8B).



**Figura 5.8: Dosagem dos níveis de triglicerídeo.** Níveis do conteúdo de triacilglicerídeos mensurados em soro (A) ou fígado (B) dos animais após 72 horas da injeção direta de PBS (controle) ou  $10^8$  *M. leprae* no tecido adiposo inguinal. Amostras de fígado dos camundongos eutanasiados foram liofilizadas e utilizadas para extração lipídica e mensuração de triacilglicerol. Gráfico representa mediana dos valores obtidos da dosagem de cada animal (A) ou apresentados relativo ao peso total do tecido (B). \*\* $p < 0.01$ , teste t não pareado.

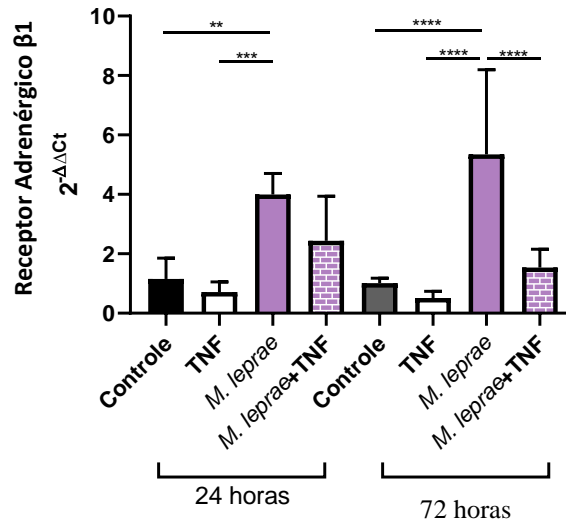
A observação do aumento lipídico hepático nos indica que a infecção com *M. leprae* ao tecido adiposo pode induzir alterações metabólicas nos animais que levam ao aumento da formação de TAG no fígado, podendo ocorrer devido à indução de mobilização lipídica observadas nas células adiposas após infecção pela micobactéria.

Adicionalmente, foram analisados os níveis séricos de HDL e LDL nos animais, no entanto os dados não apresentaram diferenças significativas da disponibilidade destas lipoproteínas entre os grupos. Além disso, o peso dos animais foi registrado antes e depois da infecção, não tendo afetado significativamente o peso corporal dos animais (dados não mostrados).

### 5.3 Análises de expressão gênica de proteínas da via lipolítica nos adipócitos

Para investigar os efeitos da infecção por *M. leprae* na ativação dos mecanismos da via de lipólise nos adipócitos, a expressão gênica de proteínas (receptores, enzimas e fatores de transcrição) foram avaliados.

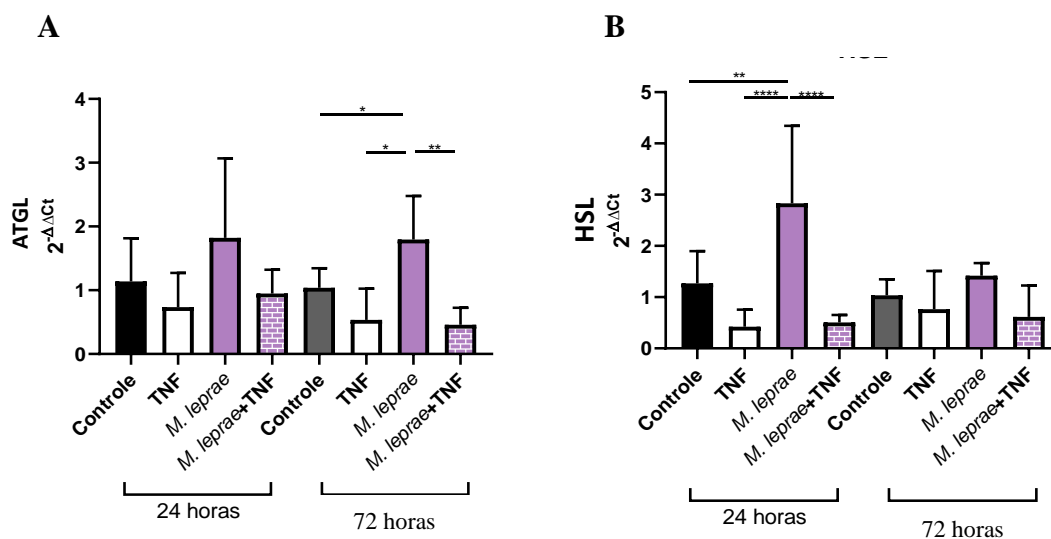
A ativação do processo de lipólise se inicia após estímulos externos aos receptores celulares, e dentre as vias clássicas de ativação deste processo nos adipócitos temos o envolvimento dos  $\beta$ -adrenorreceptores. Os níveis de expressão gênica de RNAm das culturas de adipócitos infectadas por *M. leprae* na MOI de 20:1, e/ou expostas ao TNF, utilizado como controle indutor de lipólise nestes ensaios, foram investigados nos tempos de 24 e 72 horas de infecção (figura 5.9).



**Figura 5.9: Análise de qPCR para receptor adrenérgico  $\beta 1$  em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$ desvio padrão. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , One-way ANOVA.

A análise dos níveis de RNAm dos receptores adrenérgicos  $\beta 1$  demonstram um significativo aumento na expressão de seus genes nas culturas quando infectadas por *M. leprae* em 24 horas, e que persiste após 72 horas de infecção.

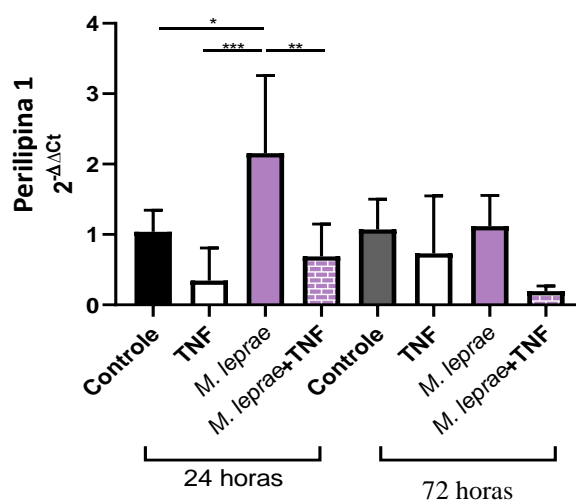
As enzimas das etapas iniciais do processo de lipólise ATGL e HSL também foram analisadas e sua expressão gênica representada na figura 5.10.



**Figura 5.10: Análise de qPCR para lipase de triglicerídeo em tecido adiposo (ATGL) e lipase hormônio sensível (HSL) em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de ATGL (A) e HSL (B) foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , One-way ANOVA; Valores entre ATGL controle e *M. leprae* 48 horas realizado teste t não pareado.

Apesar dos valores de expressão da enzima ATGL nas culturas infectadas por *M. leprae* apresentarem diferenças significativas apenas após 72 horas, a enzima HSL apresenta evidente modulação já nas primeiras 24 horas, mantendo-se elevada 48 horas após a infecção. Adicionalmente, a presença de TNF nas culturas infectadas parece bloquear a indução da expressão desta enzima (figura 5.10A e B).

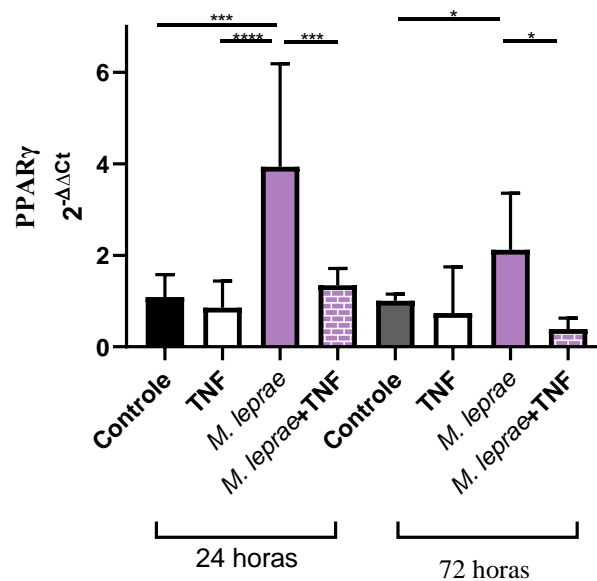
Presentes no entorno dos corpúsculos lipídicos e com importante envolvimento no processo de lipólise nas células, os níveis de expressão de perilipinas também foram analisados (figura 5.11).



**Figura 5.11: Análise de qPCR para perilipina 1 em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao

controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA.

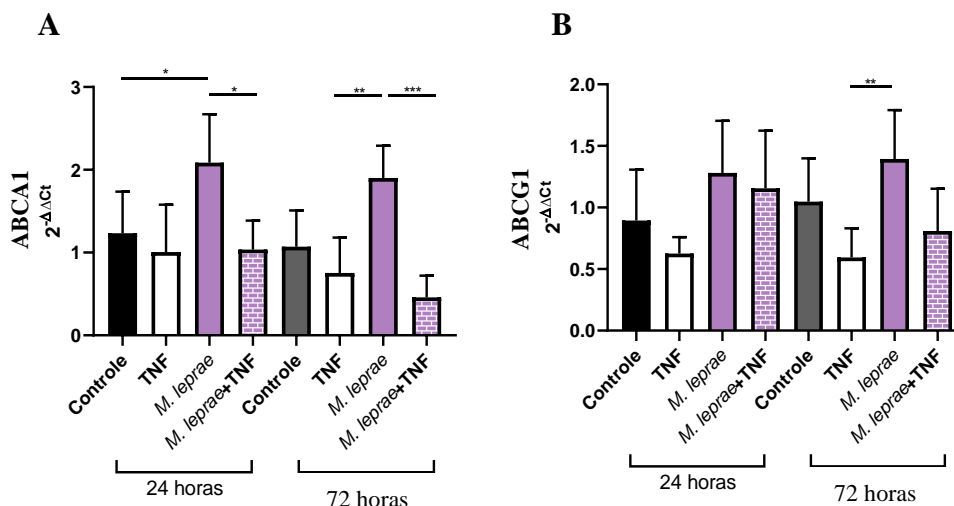
Neste dado, os níveis de expressão gênica das perilipinas se encontram significativamente elevados nas culturas de adipócitos quando infectadas por *M. leprae* por 24 horas, efeito, no entanto, não visto no tempo de 48 horas de infecção. As culturas infectadas com a presença de TNF por sua vez apresentam níveis de expressão gênica desta proteína semelhante aos níveis apresentados nas culturas controles não infectados. Seguindo as análises das moléculas envolvidas no metabolismo lipídico celular, os níveis dos fatores de transcrição PPAR $\gamma$  foram investigados (figura 5.12).



**Figura 5.12: Análise de qPCR para receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR $\gamma$ ) em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , One-way ANOVA; Valores entre PPAR $\gamma$  controle e *M. leprae* 48 horas realizado teste t não pareado.

Neste resultado podemos observar considerável indução da expressão gênica do fator de transcrição PPAR $\gamma$  nas culturas infectadas em ambos os tempos de infecção. Adicionalmente, culturas infectadas que receberam estímulos por TNF apresentam níveis inalterados de expressão.

Para investigar os efeitos do efluxo da molécula de colesterol pelas células infectadas, os níveis de expressão gênica de seus transportadores celulares ABCA1 e ABCG1 foram analisados (figura 5.13).



**Figura 5.13: Análise de qPCR para o transportador de cassetes de ligação ao ATP A1 (ABCA1) e o de subfamília G (ABCG1) em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de ABCA1 (A) e ABCG1 (B) foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA.

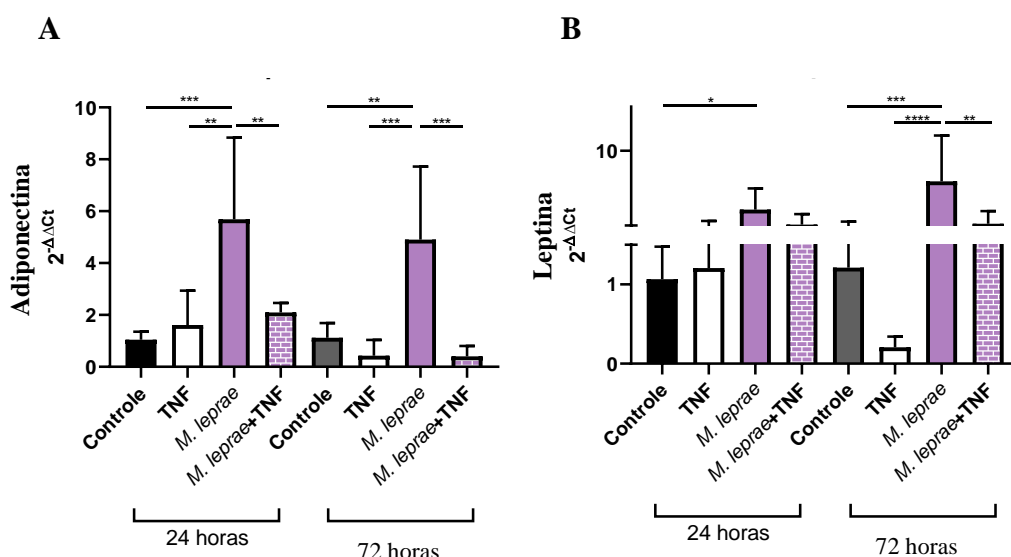
A expressão gênica dos transportadores ABCA1 se apresentam aumentados quando as culturas de adipócitos são infectadas pelo *M. leprae* no tempo de 24 horas, e, apesar de não apresentarem diferenças significativas, é possível inferir que talvez se mantenham elevados também após 72 horas de infecção. O estímulo pró-lipólise utilizado aqui, adição de TNF, não alteraram os níveis de expressão do receptor, se mantendo semelhante aos respectivos controles não infectados (figura 5.13A).

Já o transportador ABCG1 parece também ser regulado positivamente pela infecção, porém apresentou diferença estatística apenas quando comparado com o estímulo TNF (figura 5.13B). Desta forma, esta informação necessita confirmação posterior.

A expressão gênica das moléculas AMPK $\alpha$ 1, HIF-1 $\alpha$  e ADRP (Perilipina 2) também foram analisadas, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre as condições experimentais (dados não apresentados).

#### 5.4 Análises de expressão gênica de adipocinas

A expressão gênica de adipocinas produzidas pelas culturas de adipócitos infectadas e/ou expostas ao TNF também foi analisada. Para se investigar o perfil imunomodulador das culturas infectadas, foram analisadas a expressão de RNAm das moléculas adiponectina e leptina (figuras 5.14).



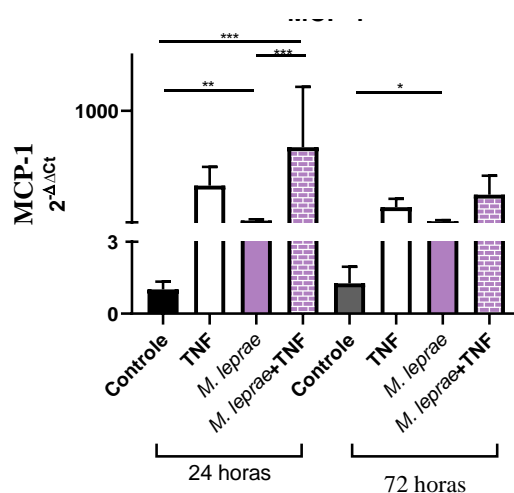
**Figura 5.14: Análise de qPCR para adiponectina e leptina em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de adiponectina (A) e leptina (B) foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , One-way ANOVA. Realizado teste t não pareado entre as condições leptina controle e infectado por *M. leprae* 24 horas.

Neste dado podemos afirmar um significativo aumento na expressão gênica de adiponectina, se apresentando com níveis bastante elevados nas células infectadas com *M. leprae* nos dois tempos experimentais. A presença de TNF nas culturas infectadas parece inibir essa indução da expressão gênica de adiponectina pela infecção micobacteriana (figura 5.15A).



A expressão gênica de leptina também aparece com seus níveis elevados nas culturas infectadas no tempo de 24 horas, ocorrendo aumento expressivo no tempo de 72 horas de infecção. Esta proteína por sua vez não obteve redução nos seus níveis de expressão após estímulo de TNF em culturas infectadas (figura 5.14B).

Ainda, os níveis de expressão da quimiocina MCP-1 nas culturas de adipócitos também foram mensurados (figura 5.15).



**Figura 5.15: Análise de qPCR para a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) em adipócitos 3T3-L1.** Os níveis de expressão gênica de RNAm foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle não infectado nos tempos de 24 e 72 horas de infecção, de dois experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). Gráfico representa média ± desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA; Realizado teste t não pareado entre as condições MCP-1 controle e infectado por *M. leprae* 24 e 72 horas.

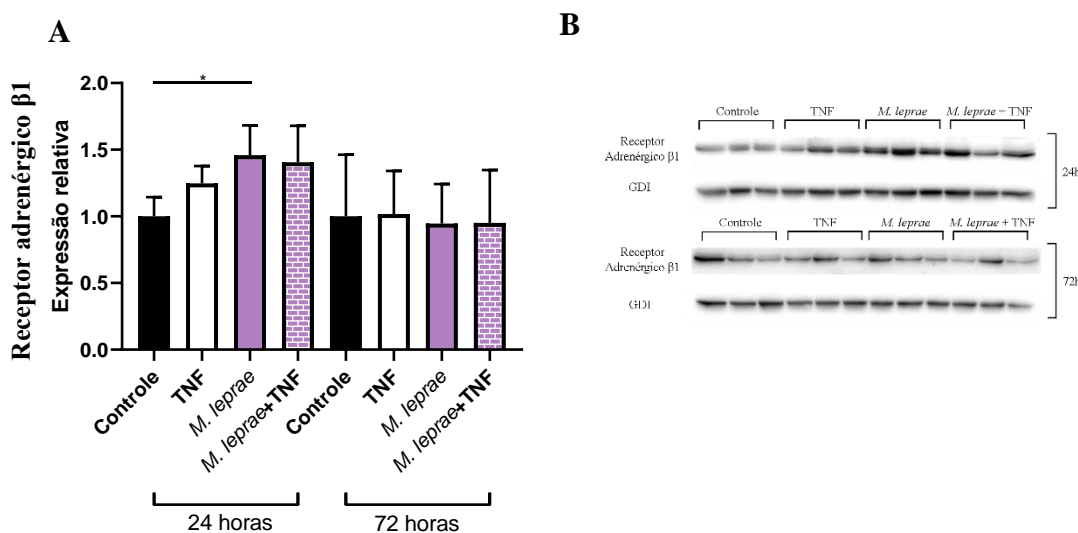
Os níveis de expressão gênica de MCP-1 também se apresentaram elevados nas condições infectadas por *M. leprae* nos tempos de 24 e 72 horas, com aumento ainda maior dos níveis da adipocina quando há a presença de TNF nas culturas infectadas.

A expressão gênica de IL10, IL6 e TNF também foram investigados, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre as condições de interesse analisadas (dados não mostrados).

## 5.5 Análise da produção de proteínas do metabolismo lipídico e adipocinas nos adipócitos

Seguindo com as investigações sobre a modulação lipídica que ocorre nos adipócitos infectados com *M. leprae*, níveis das proteínas envolvidas neste processo foram analisadas.

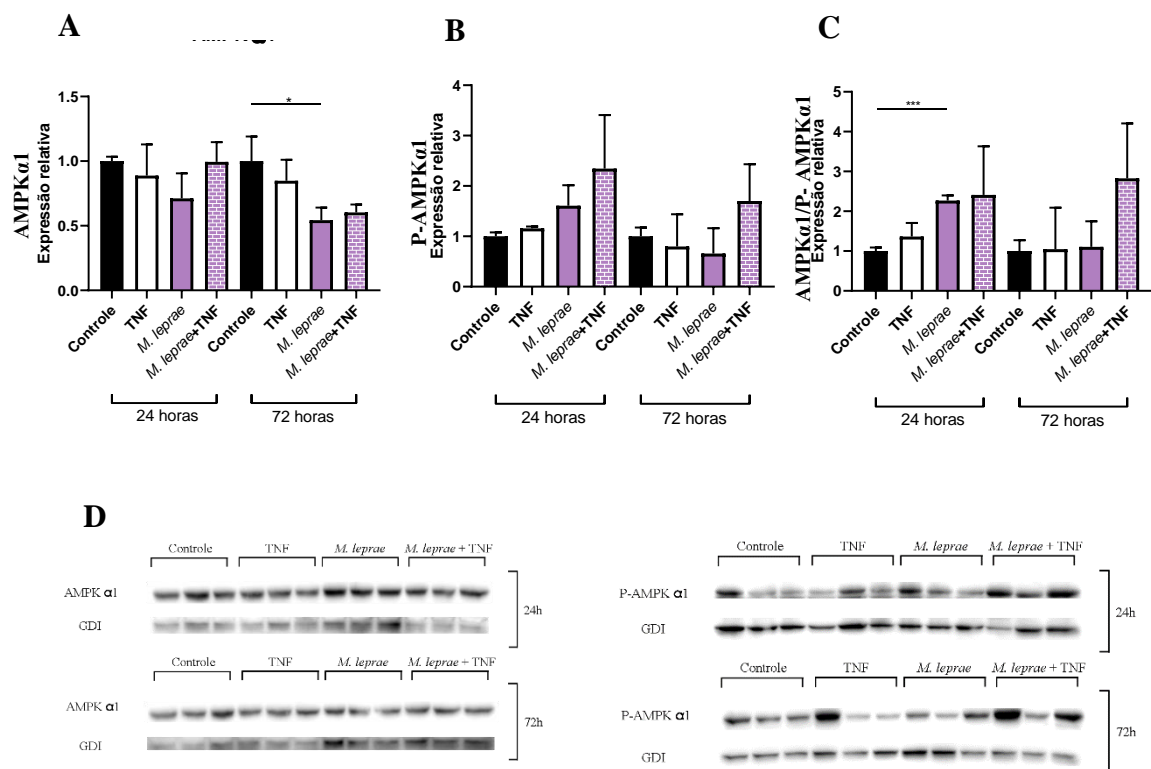
Os lisados das culturas celulares infectadas por *M. leprae* (MOI 20:1) e/ou expostas ao TNF foram processados para análise por western blotting e revelação das bandas proteicas por quimioluminescência e posterior quantificação de seus respectivos sinais pelo software *Image Studio Lite Ver 5.2* (LI-COR Biosciences). A mensuração dos níveis do receptor adrenérgico  $\beta 1$  está representada na figura 5.16.



**Figura 5.16: Análise por imunoblotting do receptor adrenérgico  $\beta 1$  em adipócitos.** Análise quantitativa de western blotting de lisados celulares (A). Western Blotting representativo (B). Os valores foram normalizados pelos níveis da proteína endógena GDI e calculados em relação a condição controle não infectada nos tempos de 24 e 72 horas de um experimento feito em triplicata. *M. leprae* (MOI 20:1). \* $p < 0.05$ , realizado teste t não pareado entre as condições controle e *M. leprae* no tempo de 24 horas.

Apesar de ser um dado preliminar com apenas um grupo experimental analisado, os níveis de adrenoceptores-  $\beta 1$  se apresentaram elevados nas culturas infectadas. As outras condições analisadas, no entanto, não apresentaram diferenças significativas.

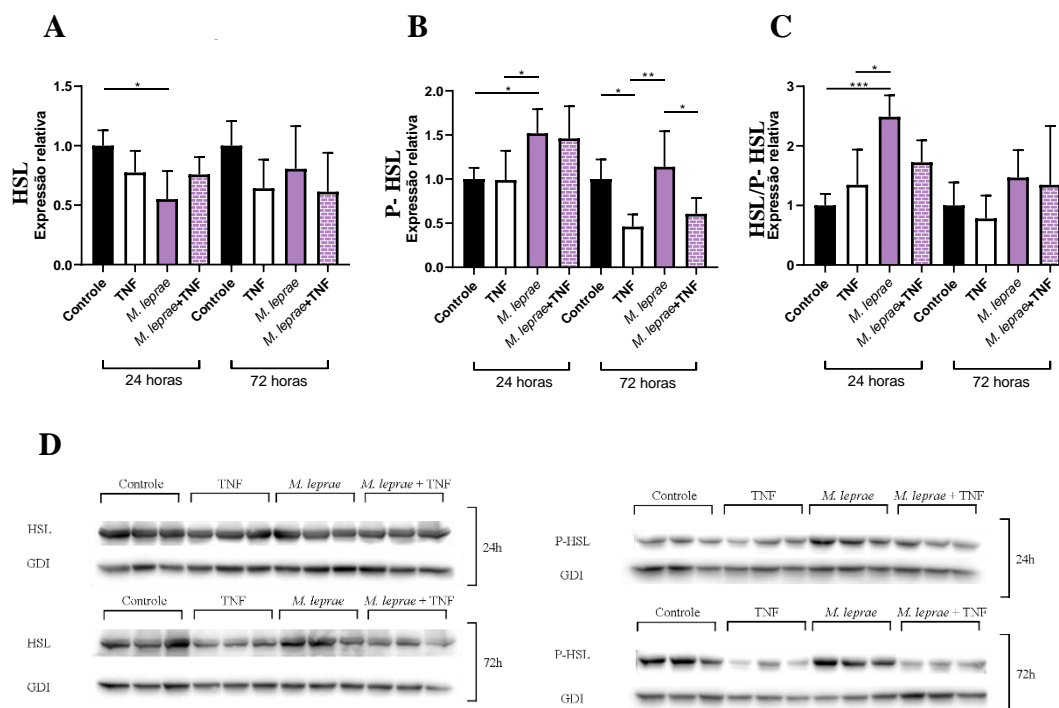
Os níveis da enzima AMPK e sua forma ativa fosforilada também foram analisados e representados na figura 5.17.



**Figura 5.17: Análise por imunoblotting da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) alpha 1 em adipócitos.** Análise quantitativa de western blotting da proteína AMPKα1 (A) e sua forma ativa fosforilada (B) em lisados celulares. A expressão relativa dos níveis da forma ativa da proteína foi calculada em relação aos seus níveis na forma inativa (C). Western Blotting representativo (D). Os valores foram normalizados pelos níveis da proteína endógena GDI e calculados em relação a condição controle não infectada nos tempos de 24 e 72 horas de um experimento feito em triplicata. *M. leprae* (MOI 20:1). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA; Realizado teste t não pareado entre as condições controle e *M. leprae* no tempo de 24 horas no gráfico de razão entre a forma inativa e fosforilada da proteína (C).

A produção de AMPKα1 em sua forma inativa se apresentou reduzida nas culturas infectadas por *M. leprae* (figura 5.17A), no entanto, em sua forma ativa (fosforilada), seus níveis aparecem significativamente aumentados no tempo de 24 horas de infecção pela micobactérias (figura 5.17B). Dessa forma, observamos que a relação entre a forma fosforilada e não fosforilada encontra-se significativamente aumentada 24 horas após a infecção, sendo esse efeito dissipado após 72 horas (figura 5.17C).

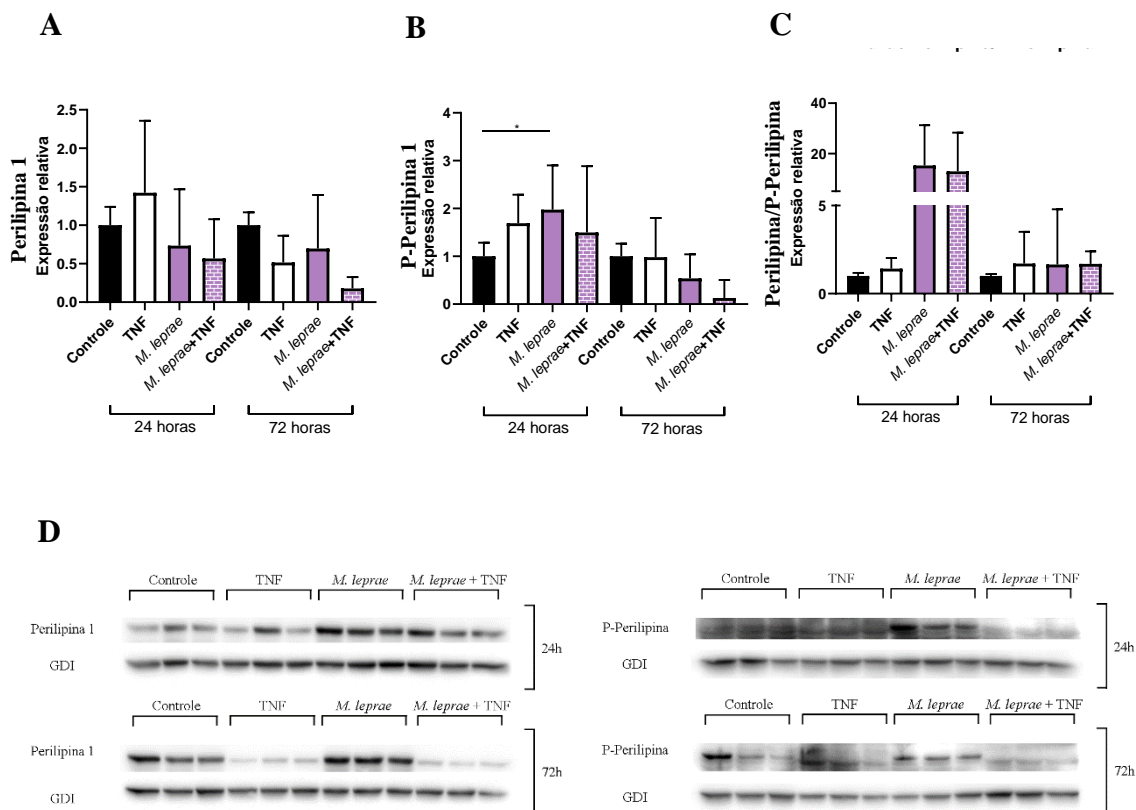
O envolvimento da enzima lipolítica HSL também foi investigado (figura 5.18).



**Figura 5.18: Análise por imunoblotting de lipase hormônio sensível (HSL) em adipócitos.** Análise quantitativa de western blotting da proteína HSL (A) e sua forma ativa fosforilada (B) em lisados celulares. Western Blotting representativo (D). A expressão relativa aos níveis da forma ativa da proteína foi calculada em relação aos seus níveis na forma inativa (C). Os valores foram normalizados pelos níveis da proteína endógena GDI e calculados em relação a condição controle não infectada nos tempos de 24 e 72 horas de um experimento feito em triplicata. *M. leprae* (MOI 20:1). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA.

Neste dado, a enzima chave para o desencadeamento do processo de lipólise em sua forma inativa demonstra menor produção em culturas infectadas (A), mas se apresenta com níveis aumentados em sua forma fosforilada ativada em culturas infectadas pelo *M. leprae* (B), e, apesar de valores sem diferença significativa nas amostras analisadas, também parece ter níveis maiores que nos controles nas culturas infectadas no tempo de 48 horas. Quando feito o cálculo de razão entre as formas inativa e ativa da proteína, fica mais evidente a presença aumentada de HSL na condição infectada por *M. leprae* no tempo de 24 horas de infecção (C). Vale mencionar que a adição de TNF, conhecido indutor de lipólise, nas culturas de adipócitos não estimularam um aumento na produção da enzima nos tempos e amostras analisadas.

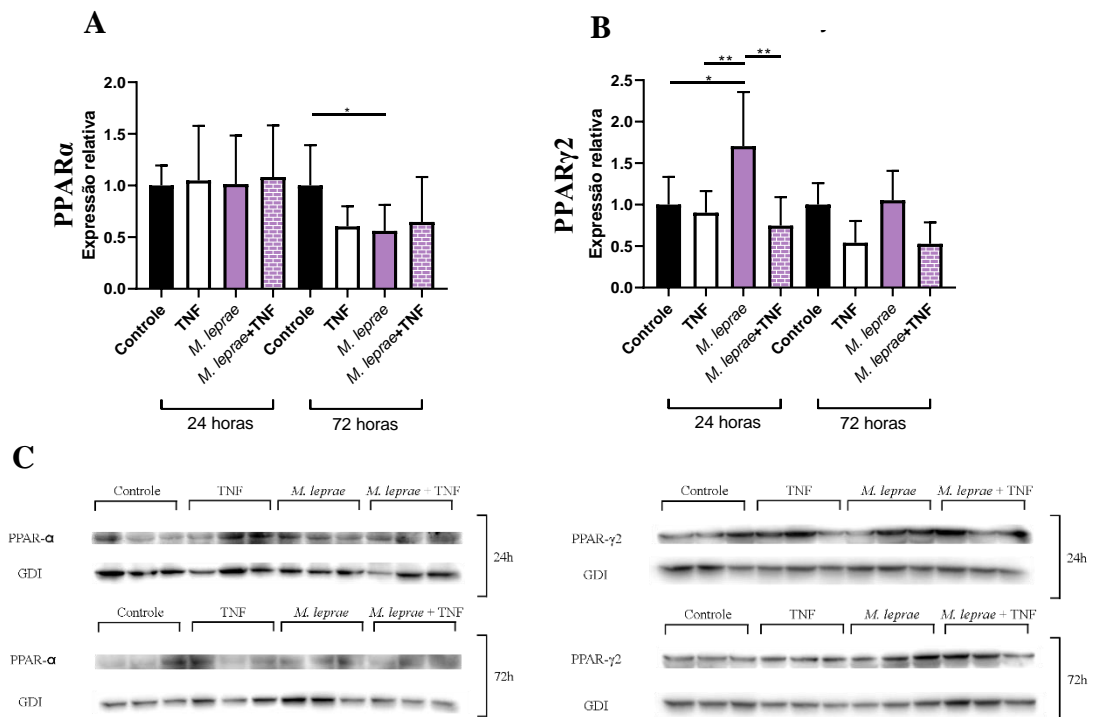
Na sequência, os níveis proteicos de perilipinas foram analisados nas culturas celulares (figura 5.19).



**Figura 5.19: Análise por imunoblotting de perilipina 1 em adipócitos.** Análise quantitativa de western blotting da proteína perilipina (A) e sua forma ativa fosforilada (B) em lisados celulares. Western Blotting representativo (D). A expressão relativa dos níveis da forma ativa da proteína foi calculada em relação aos seus níveis na forma inativa (C). Os valores foram normalizados pelos níveis da proteína endógena GDI e calculados em relação a condição controle não infectada nos tempos de 24 e 72 horas de dois experimentos feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). \* $p < 0.05$ , teste t não pareado.

Neste resultado as diferentes condições analisadas não apresentaram diferenças significativas na produção de perilipina em sua forma inativa (A), no entanto sua forma ativa fosforilada aparece aumentada na condição infectada por *M. leprae* (B). Quando realizado o cálculo de razão entre a forma inativa e ativa da proteína, os níveis de perilipina fosforilada aparecem mais altos nas culturas infectadas (C), no entanto devido à variação entre os valores das replicatas experimentais, esta análise não apresenta diferenças significantes entre as condições.

A produção dos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico das células PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  foram analisados (figura 5.20).



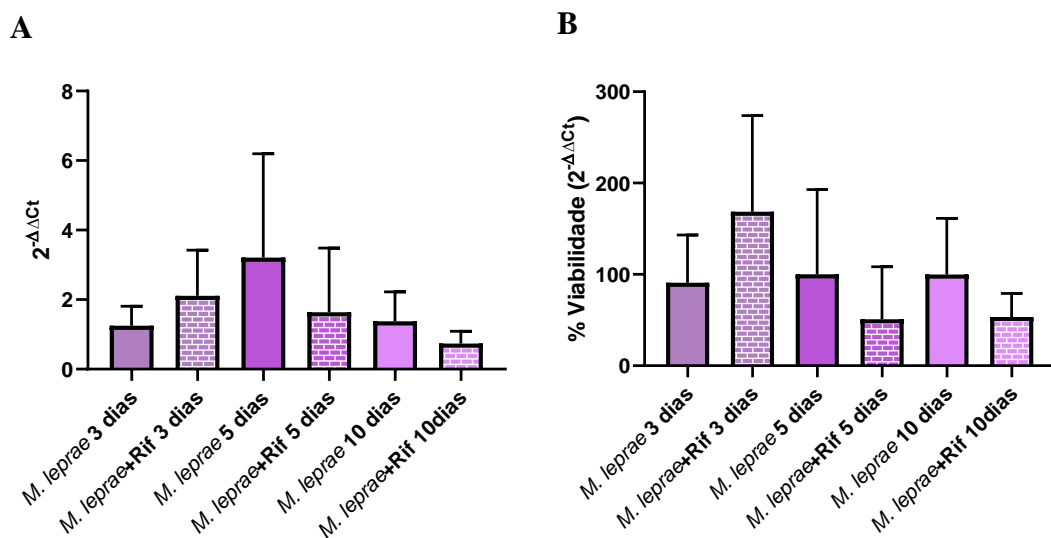
**Figura 5.20: Análise por imunoblotting de receptores ativados por proliferador de peroxissoma alpha (PPAR $\alpha$ ) e gamma (PPAR $\gamma$ ) em adipócitos.** Análise quantitativa de western blotting de PPAR $\alpha$  (A) e PPAR $\gamma$  (B) em lisados celulares. Western Blotting representativo (C). Os valores foram normalizados pelos níveis da proteína endógena GDI e calculados em relação a condição controle não infectada nos tempos de 24 e 72 horas de dois experimentos feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 20:1). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , One-way ANOVA. Realizado teste t não pareado entre as condições PPAR $\alpha$  controle e infectado por *M. leprae* 72 horas. A análise representa os níveis de PPAR $\gamma$ 2. Os níveis de PPAR $\gamma$ 1 também foram mensurados, no entanto não apresentaram diferenças significantes entre as condições de interesse.

Aqui podemos observar que os níveis de PPAR $\alpha$  no tempo de 24 horas não tiveram diferenças entre as amostras analisadas, no entanto seus níveis foram significativamente reduzidos após 48 horas de infecção por *M. leprae* (A). Diferentemente, os níveis de PPAR $\gamma$  se apresentaram elevados após 24 horas de infecção pela micobactéria, mas sem alterações significantes nas condições analisadas em 48 horas (B).

Também foi analisada a produção das proteínas ATGL, adiponectina e seus receptores tipo 1 e tipo 2, porém não apresentaram diferenças significativas entre as condições de interesse.

## 5.6 Viabilidade de *Mycobacterium leprae*

Para determinar se o ambiente intracelular dos adipócitos ajuda a manter a bactéria viável por longos períodos *in vitro*, as culturas celulares foram infectadas com *M. leprae* na MOI 50:1 e mantidas pelos tempos de 3, 5 e 10 dias de infecção para análise da viabilidade micobacteriana por qPCR. Para observar se o ambiente intracelular dos adipócitos poderia conferir proteção ao bacilo às drogas utilizadas no controle da doença, foram feitos ensaios adicionando rifampicina ao longo das 48 horas finais de exposição. Os resultados deste experimento estão apresentados na figura 5.21.

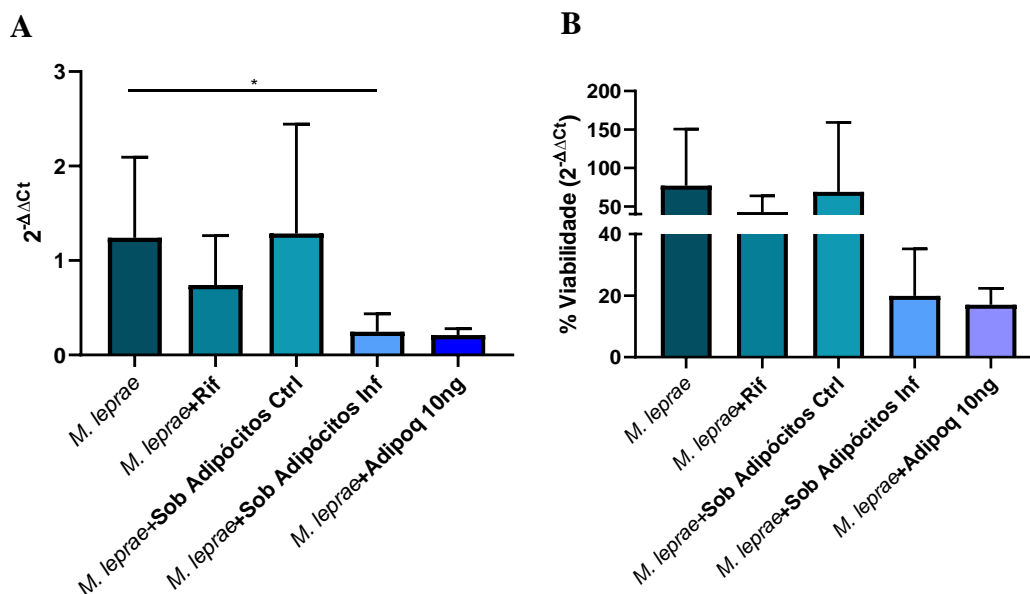


**Figura 5.21: Viabilidade do *Mycobacterium leprae* em culturas de adipócitos 3T3-L1.** Após 3, 5 e 10 dias de infecção com o bacilo *M. leprae* (MOI 50:1) em adipócitos maduros, foi feita extração de ácidos nucleicos nas amostras celulares e os níveis de RNA determinados e normalizados pelos níveis de DNA do gene 16S de *M. leprae* (A). Valores dos níveis de viabilidade da bactéria representados em porcentagem (B). Dados das condições com adição de 1µg/mL de rifampicina por 48 horas representados em relação às condições infectadas em seus respectivos tempos experimentais. Os valores representam a média ±desvio padrão. Resultado representativo de três experimentos independentes. Teste Mann-Whitney, diferenças não significativas.

Neste ensaio pudemos confirmar que a micobactéria se mantém viável nas culturas de adipócitos até o tempo de 10 dias de infecção analisado. A metodologia, no entanto, é limitada para definir o quanto de bactérias se mantiveram viáveis entre as condições investigadas, sendo necessário normalizarmos a eficiência da extração de RNA das diferentes culturas de adipócitos ao longo do tempo.

Neste dado podemos também inferir sobre o efeito da adição de rifampicina nas culturas. Em todas as culturas, bacilos intracelulares foram expostos a rifampicina na concentração de 1 µg/mL. Os dados apontam impacto de em torno de 50% na viabilidade micobacteriana em culturas de adipócitos após 5 e 10 dias de infecção (figura 21B).

Adicionalmente, foi feito ensaio para se investigar o impacto de sobrenadantes de culturas de adipócitos na viabilidade micobacteriana em macrófagos (figura 5.22).



**Figura 5.22: Viabilidade do *Mycobacterium leprae* em culturas de macrófagos Raw 264.7.** Após 3 dias de infecção com o bacilo *M. leprae* (MOI 50:1) em culturas de macrófagos, foi feita extração de ácidos nucleicos nas amostras celulares e os níveis de RNA determinados e normalizados pelos níveis de DNA do gene 16S de *M. leprae*. Valores dos níveis de viabilidade da bactéria representados em porcentagem (B). Dados das condições com adição de 1μg/mL de rifampicina, adição de sobrenadante de culturas de adipócitos controle, adição de sobrenadante de cultura de adipócitos infectados, adição de sobrenadante de culturas de adipócitos expostos a TNF, sobrenadante de culturas de adipócitos infectados e expostos ao TNF por 48 horas ou adição de 10ng/mL de adiponectina estão representados em relação à condição de macrófagos infectados (somente *M. leprae*). Os valores representam a média ±desvio padrão. Resultado representativo de dois experimentos independentes. \*p<0.05, teste t não pareado.

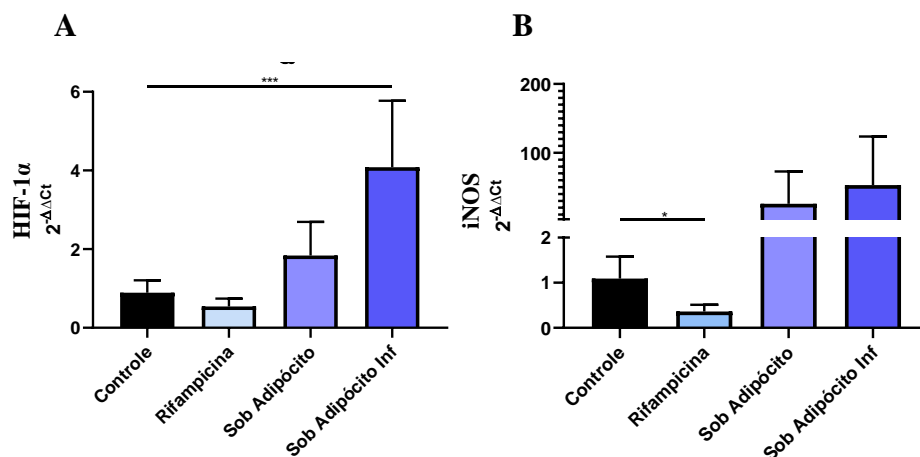
Neste ensaio podemos observar que a viabilidade do *M. leprae* em culturas de macrófagos é aparentemente reduzida quando estas células são expostas ao meio condicionado de adipócitos infectados. Interessantemente podemos ver o mesmo efeito de viabilidade reduzida quando estas culturas infectadas foram expostas somente à adiponectina, observada sendo induzida pela infecção dos adipócitos (figura 5.14), onde observamos uma redução de 85% da viabilidade quando comparada à condição envolvendo macrófagos infectados sem adição de estímulos (figura 22B). O presente experimento precisa ser repetido para alcançarmos diferenças estatísticas significativas.



## 5.7 Análise de modulação gênica em macrófagos

A partir do interesse em se investigar se a infecção por *M. leprae* nos adipócitos ocasiona uma modulação inflamatória em macrófagos, sobrenadantes de culturas de adipócitos infectados ou não pela micobactéria foram adicionados em culturas de macrófagos *in vitro* e as células mantidas por 3 dias expostas aos estímulos.

Os resultados das análises de expressão gênica para os genes marcadores de estresse oxidativo HIF $\alpha$  e iNOS estão representados na figura 5.23A e B, e das moléculas inflamatórias Kc (CXCL1), IL10 e IL6 apresentados na figura 5.24A, B e C.

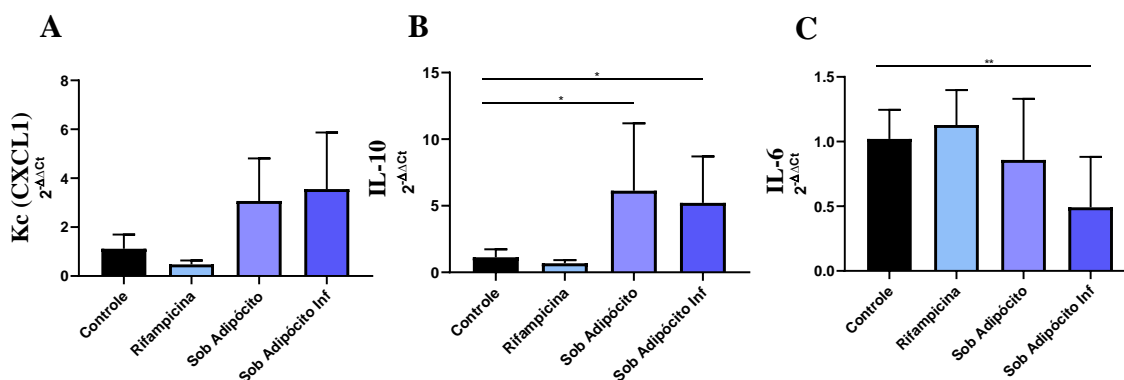


**Figura 5.23: Análise de qPCR para genes de estresse oxidativo em macrófagos.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de HIF $\alpha$  (A) e iNOS (B) foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle sem estímulos. Dados de culturas de macrófagos expostas a 1 $\mu$ g/mL de rifampicina, sobrenadante de culturas de adipócitos controle ou sobrenadante de cultura de adipócitos infectados em dois e três experimentos independentes, respectivamente, feitos em duplicatas. Gráfico representa média  $\pm$ desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA em HIF $\alpha$  (A); Dados de iNOS (B) realizado teste Kruskal-Wallis.

Neste dado podemos observar que as culturas de macrófagos expostas aos sobrenadantes dos adipócitos parecem demonstrar expressão gênica destes fatores de resposta ao estresse oxidativo aumentadas em relação aos controles não estimulados ou com adição de rifampicina.

A resposta dos macrófagos também foi avaliada analisando a expressão da quimiocina Kc, forma murina da proteína CXCL1 humana, e das citocinas IL10 e IL6. Nestes dados, apesar

de valores sem diferenças significativas, as culturas expostas ao sobrenadante de adipócitos não infectados e infectados com *M. leprae* apresentam níveis mais aumentados da quimiocina (figura 5.24A), também níveis significativamente aumentados da citocina IL-10 (B) e somente após exposição dos macrófagos ao meio condicionado de adipócitos infectados, uma destacada redução nos níveis de expressão gênica de IL-6 (C).

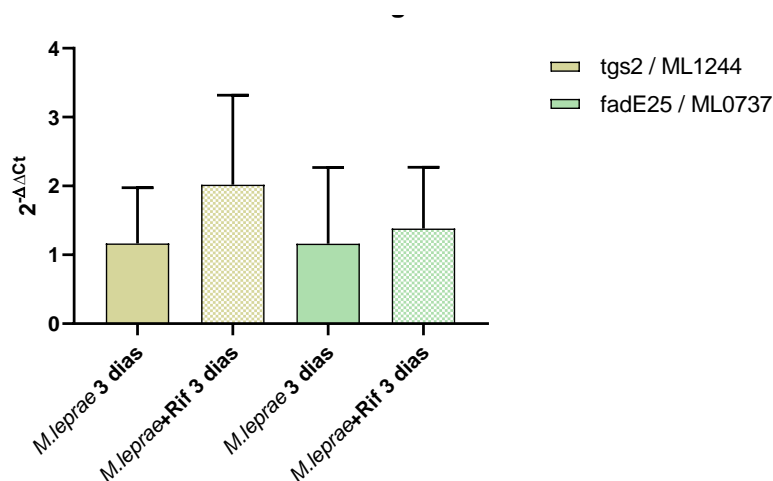


**Figura 5.24: Análise de qPCR para genes de citocinas em macrófagos.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de Kc (CXCL1) (A), IL-10 (B) e IL-6 (C) foram normalizados pelo gene de referência GAPDH e os valores calculados e representados relativos ao controle sem estímulos. Dados de culturas de macrófagos expostas a 1µg/mL de rifampicina, sobrenadante de culturas de adipócitos controle ou sobrenadante de cultura de adipócitos infectados em dois, três e três experimentos independentes, respectivamente, feitos em duplicatas. Gráfico representa média  $\pm$ desvio padrão. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA em Kc (A) e IL-6 (C); Dados de IL-10 (B) realizado teste Kruskal-Wallis.

### 5.8 Investigação de genes de latência em *Mycobacterium leprae*

É conhecido que, semelhante ao *M. leprae*, o patógeno *M. tuberculosis* também apresenta importante interação com lipídios na célula hospedeira para o sucesso da infecção. Além disso, já foi descrito que a micobactéria entra em estado de latência no ambiente lipídico rico em colesterol e ácidos graxos, induzindo a expressão de diversos genes, dentre estes alguns envolvidos no metabolismo lipídico e energético (AGUILAR-AYALA *et al.*, 2017). A partir desses dados da literatura, investigamos se o *M. leprae* também se adaptaria ao ambiente intracelular dos adipócitos a um estado de latência. Para isso, *primers* para genes de *M. leprae* ortólogos aos de latência em *M. tuberculosis* foram desenhados com a colaboração do Dr. Milton Osório e do Bel. Meydson Correa do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Para análise da expressão gênica dos genes *tgS2* (ML1244), ortólogo Rv2484c em *M. tuberculosis*, e *fadE25* (ML0737), ortólogo de *fadE7* e *fadE9* em *M. tuberculosis* por

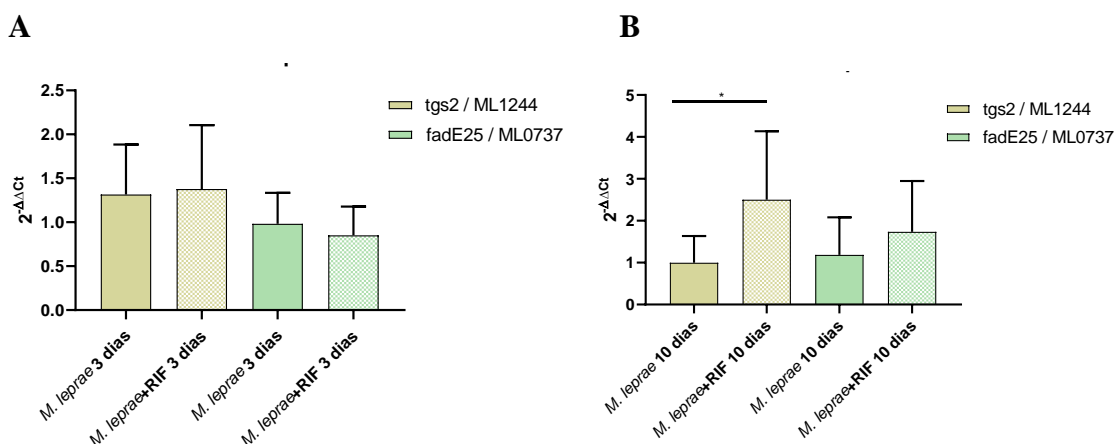
qPCR após infecção nas culturas de macrófagos após 3 dias de infecção (figura 5.25) e adipócitos após 3 ou 10 dias de infecção (figura 5.26A e B).



**Figura 5.25: Análise de qPCR para genes de latência de *Mycobacterium leprae* em macrófagos.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de genes de latência ortólogos ao *M. tuberculosis* em *M. leprae* foram normalizados pelos níveis de RNAr 16S e os valores das culturas infectadas com adição de 1µg/mL de rifampicina foram calculados e representados relativos à condição infectada após 3 dias de infecção, de quatro experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 50:1). Gráfico representa média ±desvio padrão. Teste Mann-Whitney, diferenças não significativas.

Nas culturas de macrófagos infectadas por 3 dias, a micobactéria apresentou níveis dos genes de latência analisados em culturas sem adição da droga semelhantes a condição com adição de rifampicina, destacando somente uma tendência de níveis mais elevados do gene *tgs2* após exposição à droga. No entanto, para confirmação destas observações se fazem necessários mais ensaios futuros.

Os níveis de expressão gênica destes genes pela micobactéria também foram analisados após infecção em adipócitos (figura 5.26).



**Figura 5.26: Análise de qPCR para genes de latência de *Mycobacterium leprae* em adipócitos.** Os níveis de expressão gênica de RNAm de genes de latência ortólogos ao *M. tuberculosis* em *M. leprae* foram normalizados pelos níveis de RNAr 16S e os valores das culturas infectadas com adição de 1µg/mL de rifampicina foram calculados e representados relativos à condição infectada após 3 dias de infecção, de quatro experimentos independentes feitos em triplicatas. *M. leprae* (MOI 50:1). Gráfico representa média ±desvio padrão. \*p<0.05, teste t não pareado.

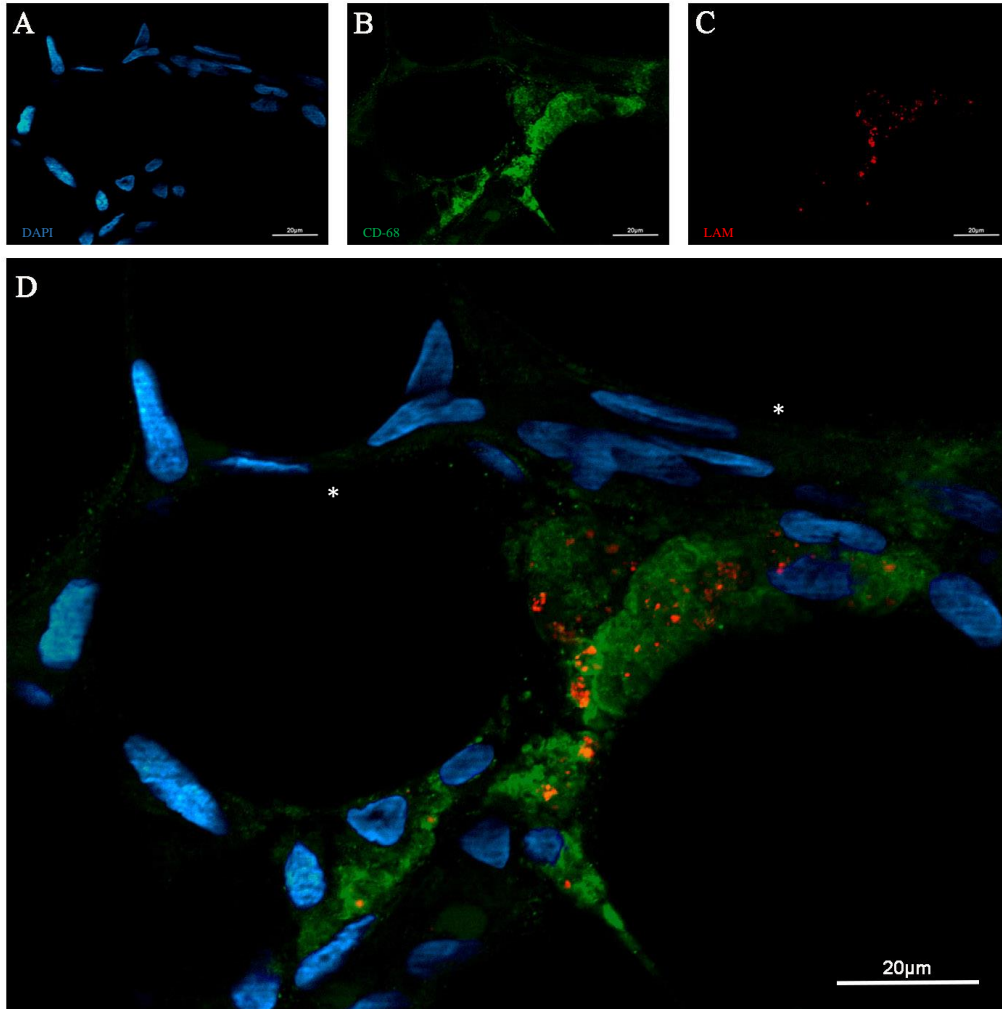
No tempo de 3 dias de infecção em culturas de adipócitos, os níveis de expressão gênica dos três genes analisados não apresentaram diferenças entre a condição infectada e a condição após adição de rifampicina (figura 26A). Analisando os mesmos genes após 10 dias de infecção nos adipócitos, porém, podemos observar um aumento nos níveis de expressão destes genes pela micobactéria após adição de rifampicina, apresentando níveis significativamente mais elevados do gene *tgs2* neste tempo de infecção (figura 5.26B).

### 5.9 Investigação *in vivo* de acesso do *M. leprae* em tecido adiposo subcutâneo

Para análise do acesso da micobactéria em tecido adiposo humano, fragmentos de biópsias de pele de pacientes acometidos pela forma multibacilar da hanseníase foram fixadas em paraformaldeído e processados para imunomarcção da presença de antígenos micobacterianos e macrófagos no tecido adiposo subcutâneo.

O acesso da micobactéria no tecido adiposo de pacientes já havia sido confirmado durante a primeira etapa do presente projeto (DOS REIS, 2016), com evidências de modulação dos corpúsculos lipídicos dos adipócitos próximos a área de infecção analisada. A presença dos

macrófagos neste ambiente, no entanto, não havia sido investigada anteriormente, sendo apresentada aqui pela figura 5.27.



**Figura 5.27: Investigação de antígenos de *Mycobacterium leprae* em tecido adiposo subcutâneo *in vivo*.** Corte óptico através de eliminação estruturada de imunofluorescência de tecido adiposo subcutâneo em fragmento de lesão de pele de paciente com a forma multibacilar de hanseníase. Os fragmentos foram fixados e submetidos a cortes de espessura de 150µm utilizando o aparelho micrótomo de navalha vibratória para marcação dos núcleos celulares por DAPI (azul) (A), imunofluorescência de macrófagos por anticorpo anti-CD-68 (verde) (B) e antígenos micobacterianos por anticorpo anti-LAM (vermelho) (C). Asteriscos evidenciam adipócitos. A composição de todas as marcações é apresentada em (D). Barra de escala representa 20µm.

Na imagem é possível confirmar que, além do *M. leprae* ter acesso ao tecido adiposo, há presença de macrófagos infectados em íntima relação com os adipócitos (área circular não corada, mas evidenciados pela morfologia de núcleo achatado - asteriscos). A observação da presença de macrófagos infectados por *M. leprae* no tecido adiposo se repete em diversos campos do fragmento de tecido adiposo subcutâneo do paciente analisado.

## 6. DISCUSSÃO

As evidências deste trabalho descrevem alterações no metabolismo lipídico de adipócitos após infecção pelo *M. leprae*. A principal delas é a indução da mobilização do conteúdo lipídico nas células infectadas. Diversos estudos já evidenciaram a importância do metabolismo lipídico para a infecção do bacilo em células de Schwann e macrófagos, apresentando a molécula de colesterol como essencial para sua sobrevivência (LOBATO et al., 2014; MATTOS *et al.*, 2014). Ao contrário das observações de acúmulo lipídico pelas células infectadas como em trabalhos anteriores, em nossos dados, adipócitos apresentam intensa redução de seu conteúdo lipídico, com aumento do efluxo de colesterol pelas células infectadas *in vitro* (figuras 5.3 e 5.5), muito provavelmente através da ativação e super expressão do receptor  $\beta$ -adrenérgico 1 (figura 5.9), levando à ativação do sensor de homeostase energética AMPK (figura 5.17) e subsequente ativação das enzimas HSL e ATGL (figuras 5.10 e 5.18).

As mudanças no metabolismo lipídico durante a hanseníase já foram correlacionadas com a disfunção de HDL. Estudos do nosso grupo demonstraram níveis plasmáticos de colesterol diminuídos em pacientes multibacilares devido a deficiência de seu transporte pela disfunção da molécula de HDL que apresentaram níveis reduzidos de apolipoproteína A-1 (ApoA-1), importante proteína presente na composição de HDL, que é produzida no fígado. Mudanças na expressão de APOA-1 foram observadas em hepatócitos infectados por *M. leprae* e, além disso, foram demonstradas alterações morfológicas e vasculares em fígado de paciente, apontando o envolvimento hepático na doença (LEMES, 2020). O envolvimento hepático já havia sido descrito na hanseníase, onde pacientes lepromatosos apresentaram anormalidades no fígado semelhantes a esteatose hepática (FERRARI et. al., 2002).

Dados em nosso modelo *in vivo* demonstraram aumento na disponibilidade de colesterol em soro dos animais após entrada do *M. leprae* no tecido adiposo inguinal, confirmando que a indução da lipólise dos adipócitos observada *in vitro* é um fenômeno também relevante *in vivo* (figura 5.6). Adicionalmente, observamos acúmulo de triacilglicerídeos hepáticos nestes mesmos animais (figura 5.8B), sendo a esteatose hepática outro indício da mobilização dos estoques lipídicos em tecido adiposo infectado.

Adicionalmente a estas observações, os níveis dos transportadores da molécula de colesterol nos adipócitos foram avaliados em nosso modelo *in vitro*, onde foi observada expressão gênica aumentada da proteína transportadora ABCA1 após 24 horas de infecção

(figura 5.13A). Apesar de não apresentar valores com diferenças significativas entre as amostras analisadas, os níveis de ABCG1 apresentam aparente aumento quando as culturas são infectadas pela micobactéria (figura 5.13B). Tais análises serão repetidas para reforçar o fenômeno observado.

A infecção por parasitas no tecido adiposo pode ocasionar a utilização das reservas lipídicas dos adipócitos para sua persistência no tecido, sendo esta a fonte do processo de lipólise. Esse fenômeno já visto durante a infecção por *T. cruzi*, onde a expressão de lipases aparece aumentadas no tecido adiposo durante a infecção aguda pelo patógeno (NAGAJYOTHI, 2012). Em nossos ensaios, avaliamos o envolvimento das enzimas lipolíticas ATGL e HSL durante a mobilização lipídica gerada após a infecção por *M. leprae* nos adipócitos, utilizando drogas de efeito inibidor da atividade enzimática das respectivas proteínas. Com os dados obtidos pudemos observar que bloqueando o processo de lipólise em nosso modelo, mais significativamente a ação da enzima ATGL que HSL, foi possível reverter a intensa redução de corpúsculos lipídicos nas culturas infectadas (figura 5.2).

Seguindo as investigações do processo de lipólise estimulado nos adipócitos infectados pelo *M. leprae*, foram feitas análises de expressão gênica e da produção de proteínas envolvidas neste processo. A análise da ativação do processo lipolítico via adrenorreceptores  $\beta 1$  nos adipócitos demonstram níveis de expressão gênica e de produção desta proteína aumentados em nosso modelo, sugerindo o envolvimento dos mecanismos de ativação envolvidos a partir desta sinalização pelas células infectadas (figuras 5.9 e 5.16).

Algumas quinases são reconhecidas por serem ativadas após a sinalização por adrenorreceptores, dentre estas as AMP quinases (AMPK) (GAUTHIER *et al.*, 2008), que são importantes moléculas reguladoras da homeostase energética celular, ativando processos como a oxidação de ácidos graxos. A investigação dos níveis proteicos de AMPK $\alpha 1$  nas culturas de adipócitos infectados por *M. leprae* demonstraram níveis aumentados destas enzimas em nossos ensaios (figura 5.17), o que sugere o seu envolvimento no estímulo da oxidação de ácidos graxos oriundos da mobilização lipídica observada nestas células infectadas.

O estímulo do processo de lipólise ocorre através de um mecanismo de regulação complexo, que envolve a atividade das enzimas lipolíticas e de perilipinas para a hidrólise de triacilglicerídeos. Nossos dados demonstram níveis aumentados de expressão gênica da enzima ATGL (figura 5.10A), porém sua produção proteica não apresentou diferenças significativas

nos ensaios analisados (dados não apresentados). A expressão da enzima HSL por sua vez se apresentou com expressão elevada no tempo de 24 horas de infecção por *M. leprae* (figura 5.10B), bem como produção aumentada de seus níveis proteicos em sua forma ativada nas culturas (figura 5.18B).

Adicionalmente, os níveis de expressão gênica de perilipinas 1 se apresentaram elevados nos adipócitos após 24 horas de infecção (figura 5.11), quando também observamos o pico de fosforilação da mesma (figura 5.19B). A perilipina 1 recobre os corpúsculos lipídicos, impedindo o acesso das enzimas lipolíticas até ser fosforilada, quando então possibilita a ação das enzimas HSL e ATGL. Este conjunto de dados, portanto, nos confirmam o estímulo do processo de lipólise nos adipócitos quando infectados pela micobactéria.

Os fatores de transcrição PPARs que incluem as subfamílias PPAR $\alpha$  (predominante no fígado) e PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 2 predominante no tecido adiposo), são receptores nucleares envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados à captação e catabolismo lipídico, tendo sido descrita como crucial para sobrevivência de micobactérias (ALMEIDA *et al.*, 2012), fazendo parte do fenótipo dos macrófagos espumosos (YESSOUFOU; WAHLI, 2010), inclusive nos infectados pelo *M. leprae* (LUO, YUQIAN *et al.*, 2020).

Neste trabalho, os níveis de expressão gênica de PPAR $\gamma$ , assim como seus níveis proteicos se apresentam significativamente elevados nas culturas de adipócitos infectadas pelo *M. leprae* (figuras 5.12 e 5.20B), confirmando o aumento do catabolismo lipídico em nosso modelo de infecção. Os níveis de PPAR $\alpha$  por sua vez não apresentaram diferenças significativas em sua expressão gênica nas condições analisadas, tendo sido observada diminuição de seus níveis proteicos em culturas infectadas após o tempo de 72 horas (figura 5.20A).

Já é descrito que a ativação do fator de transcrição PPAR $\gamma$  estimula a transcrição gênica de adiponectina (MAEDA *et al.*, 2001). Apesar das evidências desta ativação a nível transcricional, outros trabalhos sugerem que a ação de PPAR $\gamma$  seja principalmente na modulação das alterações conformacionais na secreção da adiponectina (ASTAPOVA; LEFF, 2012). Interessantemente, em nosso modelo experimental, além da observação de maiores níveis de PPAR $\gamma$  pelas células infectadas por *M. leprae*, também foi observado significativo aumento nos níveis de expressão gênica de adiponectina em 24 e 72 horas após infecção nos adipócitos (figura 5.14A). Seus níveis proteicos, no entanto, não apresentaram diferenças significativas entre as condições de interesse analisadas (dado não apresentado). Por outro lado,



em dados anteriores foi demonstrado o aumento dos níveis de adiponectina em soro de pacientes da forma *borderline*-tuberculoide e em reação hansênica tipo 2 (eritema nodoso) (DOS REIS, 2016). Dessa forma, a não observação da indução proteica de adiponectina parece ser uma limitação técnica do nosso modelo experimental *in vitro*.

Dentre as análises de expressão gênica de adipocinas, além dos níveis mais elevados de adiponectina, as células infectadas apresentaram também altos níveis na expressão de leptina (figura 5.14B) e da quimiocina MCP-1 (figura 5.15), indicando uma potencial resposta imunológica por parte dos adipócitos infectados, a ser refletida no recrutamento de macrófagos, como observado na figura 5.27. Os níveis de expressão de IL6, IL-10 e TNF foram analisados, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre as condições controle e infectado por *M. leprae*.

Em resultados previamente apresentados no trabalho de mestrado (DOS REIS, 2016) foi descrito que o ambiente intracelular dos adipócitos confere viabilidade ao *M. leprae* por até 15 dias, o maior tempo já observado em modelos *in vitro* de infecção utilizando células de mamíferos. Em sequência a este trabalho, utilizamos os tempos de infecção de 3, 5 e 10 dias em culturas de adipócitos para análise do efeito da adição de rifampicina na viabilidade da micobactéria no ambiente intracelular dos adipócitos. A rifampicina foi capaz de reduzir em 50% da viabilidade do *M. leprae* após 48 horas de exposição (figura 5.21), queda semelhante a observada em populações de micobactérias no interior de macrófagos expostos ao mesmo antibiótico (figura 5.22). Dessa forma, podemos afirmar que o ambiente neutro oferecido pelo citosol do adipócito não é capaz de proteger o *M. leprae* da ação antibacteriana de rifampicina. Por outro lado, há outras maneiras do tecido adiposo, uma vez invadido, favorecer a persistência da micobactéria, sendo a modulação do ambiente através da liberação de adipocinas uma delas.

Dessa forma, nos voltamos para a análise do impacto na viabilidade do *M. leprae* no interior dos macrófagos após exposição a meios condicionados por adipócitos. Curiosamente, a presença do meio condicionado por adipócitos infectados apresentou uma significativa redução na viabilidade da micobactéria, indicando a presença de algum fator produzido pelos adipócitos infectados capaz de interferir diretamente na resolução/ativação dos macrófagos.

Dentre as adipocinas que poderiam estar envolvidas nesse fenômeno, destacamos nossa atenção à adiponectina. Há evidências de que a adiponectina pode agir como mediador anti-inflamatório regulando polarização de macrófagos, suprimindo sua ativação ao perfil M1 e

promovendo a proliferação de macrófagos M2 (LUO; LIU, 2016). As observações de Ohashi e colaboradores (2010) demonstram que macrófagos *in vitro* expostos à adiponectina apresentaram aumento nos níveis de marcadores de perfil M2 e redução de espécies reativas de oxigênio e na expressão de genes relacionados a produção destas moléculas. No entanto, a adiponectina também já foi proposta exercendo efeitos pró-inflamatórios em certas circunstâncias, por exemplo se comportando como um fator pró-inflamatório inicial em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), mas ajudando a dessensibilizar as células a estímulos pró-inflamatórios adicionais (TSATSANIS *et al.*, 2005) ou induzindo a expressão gênica e secreção de mediadores inflamatórios como IFN- $\gamma$  e IL-6 (CHENG *et al.*, 2012), o que faz desta adipocina uma molécula versátil para a resposta imune celular.

Pela adiponectina ter se apresentado com níveis de expressão aumentados durante a infecção de adipócitos e secretada no soro de pacientes acometidos pela doença, realizamos a adição desta adipocina às culturas de macrófagos infectados, onde observamos sua ação bactericida (figura 5.22).

A molécula HIF 1 $\alpha$  é um fator de transcrição que tem importante função em resposta aos níveis de oxigênio celular, induzindo a transcrição de genes envolvidos em diversos processos celulares como metabolismo energético, proliferação e sobrevivência celular, além da disponibilidade de oxigênio em resposta a situações de hipóxia (WEIDEMANN; JOHNSON, 2008), tendo sido descrita como importante fator de resposta celular contra infecções (SANTOS; ANDRADE, 2017), assim como na ativação e formação do fenótipo M1 dos macrófagos. Em nosso modelo de investigação de indução de resposta imune de macrófagos, a exposição ao meio condicionado de adipócitos infectados induziu significativamente os níveis de expressão de HIF 1 $\alpha$  pelas culturas de macrófagos *in vitro*, indicando sua ativação e provável conversão ao fenótipo M1 após 72 horas de exposição ao estímulo (figura 5.23A). Além disso, níveis aumentados da expressão de iNOS foram observados nas culturas de macrófagos (figura 5.23B), reforçando os indícios de estímulo da ativação de macrófagos em resposta ao meio condicionado por adipócitos.

Adicionalmente, já foi descrito que células infectadas por *M. leprae* apresentam perfil anti-inflamatório, com produção de altos níveis da molécula IL-10 em células de Schwann (MATTOS, 2011), indicando que a infecção por *M. leprae* pode induzir um perfil anti-inflamatório pelas células hospedeiras. Nossos dados buscaram investigar o efeito inflamatório

induzido nos macrófagos após exposição ao meio condicionado de adipócitos infectados. Nas análises de expressão gênica um número maior de replicatas será necessário para confirmarmos um possível aumento na expressão da quimiocina CXCL1 em macrófagos quando expostos aos sobrenadantes de adipócitos infectados ou não (figura 5.24A).

Os níveis de expressão da molécula IL-10 por sua vez foram significativamente induzidos após exposição ao meio dos adipócitos, no entanto sem diferenças entre a indução pelo meio de adipócitos controle ou oriundo de adipócitos infectados, sugerindo que este efeito modulatório se dá em resposta aos adipócitos *per se*. Em contrapartida, analisando os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6, as culturas de macrófagos que foram expostas ao meio condicionado de adipócitos infectados exibiram significativa redução nos níveis de expressão gênica da molécula comparada às outras condições.

Juntos, estas análises de fatores envolvidos na ativação de macrófagos nos traz indícios de que os adipócitos liberam componentes que podem modular a resposta inflamatória nos macrófagos durante a infecção. Alguns marcadores analisados, tais como iNOS, CXCL1 e IL-10 apresentaram aumento (aparentemente no caso de iNOS e CXCL1) após exposição ao meio condicionado de culturas de adipócitos infectados ou não, refletindo uma limitação do nosso modelo. Por outro lado, podemos observar um aumento significativo na expressão de HIF-1 $\alpha$  após exposição ao sobrenadante de adipócitos infectados, indicativo de ativação de macrófago, concomitante a uma redução na expressão de IL-6.

Dessa forma, concluímos que o tecido adiposo, uma vez infectado, apesar de facilitar o acesso do patógeno aos lipídeos necessários para seu metabolismo, não o blindo do contato com a rifampicina, e também não se torna um ambiente favorável a infecção, uma vez que recruta macrófagos através da expressão de CXCL1, e os torna efetores através da liberação de adiponectina e ativação de HIF-1 $\alpha$ . Dessa forma podemos teorizar que a contribuição, até agora oculta, do tecido adiposo para a patologia da doença seja a contínua oferta e deposição de lipídeos nos tecidos infectados, uma das características da histopatologia da hanseníase (AMARAL *et al.*, 2013).

Por outro lado, a persistência de *M. tuberculosis* em adipócitos já foi descrita, com observações sobre a sobrevivência da micobactéria no tecido adiposo após longos períodos protegida da ação de drogas antimicrobianas (NEYROLLES, 2006). Apesar de não ter demonstrado dificuldade em atingir o *M. leprae* no citosol dos adipócitos, a ação dos

antibióticos depende da replicação do patógeno. Dessa forma, patógenos em estado de quiescência, ou seja, com metabolismo suspenso ou extremamente suprimido, tornam-se insensíveis à sua ação.

No trabalho feito por Aguilar-Ayala e colaboradores (2017), foi realizada uma análise por RNAseq da expressão gênica de diversos genes em *M. tuberculosis* em estado de quiescência em modelo de ambiente rico em lipídeos (colesterol e ácidos graxos). A partir da análise de transcriptoma da micobactéria, diversos genes relacionados à quiescência micobacteriana foram identificados, muitos deles envolvidos no metabolismo lipídico. A partir destes dados, foi feita uma análise comparativa entre o genoma das micobactérias a fim de se identificar genes de *M. leprae* ortólogos aos de *M. tuberculosis* identificados por Aguilar-Ayala e seu grupo regulados positivamente.

Dos genes analisados, destacamos dois em nossas análises: ML1244, ortólogo do gene *tgs2* em *M. tuberculosis* Rv2484c, que é membro de uma família de genes que codificam proteínas envolvidas com o metabolismo de triacilglicerídeos e formação de corpúsculos lipídicos nas micobactérias quando em estado de latência (DANIEL *et al.*, 2004); e o gene *fadE25* (ML0737) que codifica a enzima acetil-CoA desidrogenase, ortólogo de *fadE7* e *fadE9* de *M. tuberculosis*, que são genes pertencentes à família *fadE*, envolvidos no metabolismo lipídico com a oxidação de ácidos graxos e regulação da produção de acetil-CoA (COLE *et al.*, 1998). É conhecido que o *M. leprae* apresenta aproximadamente um terço das enzimas do sistema *fad* contidas em *M. tuberculosis* (WILLIAMS *et al.*, 2004), reforçando a importância de compreender o papel de seus ortólogos funcionais na infecção por *M. leprae*.

Em nossos ensaios com culturas de macrófagos infectados por *M. leprae* pelo tempo de 3 dias não foram observadas diferenças significantes entre os níveis de expressão dos dois genes nas amostras analisadas com ou sem a adição de rifampicina. Nas culturas de adipócitos infectados por 3 dias, os genes também não apresentaram diferenças significantes entre as condições. No entanto, após 10 dias de infecção, culturas de adipócitos infectadas e expostas a rifampicina demonstraram aumento significativo nos níveis de expressão do gene ML1244, ortólogo ao gene *tgs2* em *M. tuberculosis*.

Neste trabalho foram feitas análises *in vivo* em biopsias de tecido adiposo subcutâneo de paciente acometido pela forma lepromatosa (multibacilar) da hanseníase para confirmação do acesso de macrófagos residentes ao tecido adiposo infectado. Nestas análises, observamos a

presença de inúmeros macrófagos infectados por *M. leprae* frequentemente ao redor de células adiposas, o que nos leva a inferir que o ambiente rico em lipídeos pela presença dos adipócitos pode auxiliar para a persistência da micobactéria no tecido, favorecendo novas contribuições do 'crosstalk' entre macrófagos e adipócitos para aspectos imunopatológicos ainda inexplorados no desenvolvimento da hanseníase.

*“Vamos escolher por nós mesmos o nosso caminho, e vamos tentar espalhar flores por ele.”*

(Emilie du Chatelet, matemática, física e autora.)

## 7. CONCLUSÕES

As investigações deste trabalho apontam os adipócitos, junto aos macrófagos, como importantes células durante a infecção de *M. leprae*, apresentando o tecido adiposo como sítio de infecção e persistência do patógeno que pode contribuir para o entendimento de fenômenos ainda indefinidos sobre a patologia.

Utilizando o modelo *in vitro* de infecção de adipócitos de linhagem 3T3-L1, foi possível confirmar uma intensa mobilização lipídica nas células desencadeada pela indução do processo de lipólise após infecção pela micobactéria, fenômeno este que pôde ser revertido após bloqueio da ação das enzimas lipolíticas. Junto a redução do conteúdo de triacilglicerídeos, foi observada maior disponibilidade de colesterol para o meio extracelular, molécula crucial para a sobrevivência de *M. leprae* em macrófagos e células de Schwann. Essas observações foram corroboradas com as observações de nosso modelo *in vivo* onde demonstramos o aumento dos níveis de colesterol plasmático e de conteúdo de triglicerídeo hepático nos animais infectados.

Nas culturas de adipócitos foi observado que o *M. leprae* pode se manter viável por até 10 dias, porém o ambiente intracelular oferecido pelo adipócito não é mais protetor com relação à exposição a rifampicina.

Os dados apontam que o fenótipo imunológico de macrófagos é modulado pelo adipócito infectado. Dentre estas observações, destaca-se a expressiva redução da viabilidade micobacteriana em cultura de macrófagos expostas ao meio condicionado de adipócitos infectados, provavelmente relacionado à ativação dos macrófagos devido ao aumento na liberação de adiponectina por adipócitos infectados.

Apesar de não oferecer condições favoráveis à sobrevivência do *M. leprae*, devido ao recrutamento e ativação de macrófagos após sua infecção, além de aparentemente não oferecer maior proteção ao acesso da rifampicina, o tecido adiposo tem potencial para desempenhar um importante papel no desencadeamento de processos imunopatológicos na doença, principalmente com relação aos episódios reacionais, onde uma exarcebação da resposta inflamatória é observada antes, durante ou mesmo após o fim do tratamento. A expressão de genes de latência por parte do *M. leprae* nesse tecido, e a capacidade da infecção a adipócitos modular respostas pró-inflamatórias poderiam em conjunto explicar esse tipo de evento imunológico, abrindo desta forma uma nova janela de investigação.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. **Leptospira and leptospirosis**. *Veterinary microbiology*, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AGARWAL, N. *et al.* **HIV-1 Vpr induces adipose dysfunction in vivo through reciprocal effects on PPAR/GR co-regulation**. *Science translational medicine*, v. 5, n. 213, p. 213ra164, 2013.
- AGARWAL, P. *et al.* **Mycobacterium tuberculosis can gain access to adipose depots of mice infected via the intra-nasal route and to lungs of mice with an infected subcutaneous fat implant**. *Microbial Pathogenesis*, v. 93, p. 32–37, 2016.
- AGUILAR-AYALA, D. A. *et al.* **The transcriptome of Mycobacterium tuberculosis in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- AHIMA, R. S. *et al.* **Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting**. *Nature*, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 1996.
- AJUWON, K. M.; SPURLOCK, M. E. **Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes**. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 288, n. 5, p. R1220-5, 2005.
- AKRAM SM; LADD M; KING KC. **Rickettsia Prowazekii**. 2021 Jan 31. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021
- ALMEIDA, P. E. *et al.* **PPAR $\gamma$  Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing**. *PPAR research*, v. 2012, p. 383829, 2012.
- AMARAL, J. J. *et al.* **Metabonomics Reveals Drastic Changes in Anti-Inflammatory/Pro-Resolving Polyunsaturated Fatty Acids-Derived Lipid Mediators in Leprosy Disease**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, 2013.
- AMOLE, B O *et al.* **Trypanosoma brucei: infection in murine diabetes**. *Experimental parasitology*, v. 60, n. 3, p. 342–347. 1985.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, H. R. **Parasitism of adipocytes by Trypanosoma cruzi**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.90, n.4, p. 521-522. 1995.
- ASTAPOVA, O.; LEFF, T. **Adiponectin and PPAR $\gamma$ : Cooperative and Interdependent Actions of Two Key Regulators of Metabolism**. In: *Vitamins and Hormones*, 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc. v. 90, p. 143-162. 2012.
- AVANZI, C. *et al.* **Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli**. *Science*, v. 354, n. 6313, p. 744–747. 2016.



- AYARI, A. *et al.* **Influenza infection rewires energy metabolism and induces browning features in adipose cells and tissues.** *Communications Biology*, v. 3, n. 1. 2020.
- AYYAPPAN, J. P. *et al.* **Adipose Tissue Regulates Pulmonary Pathology during TB Infection.** *American Society for Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2019.
- AZULAY-ABULAFIA, L.; SPINELLI, L. **Reverso a hanseníase de Lucio e o fenômeno de Lucio.** *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*, v. 33, n. 3, p. 125–133, 2005.
- BACCHETTI, P. *et al.* **Fat distribution in men with HIV infection.** *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, v. 40, n. 2, p. 121–131, 2005.
- BALAMAYOORAN, G. *et al.* **The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*.** *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 1, p. 108–115, 2015.
- BECHAH, Y. *et al.* **Adipose tissue serves as a reservoir for recrudescence *Rickettsia prowazekii* infection in a mouse model.** *PloS one*, v. 5, n. 1, p. e8547, 2010.
- BECHAH, Y. *et al.* **Persistence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in murine adipose tissue.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, 2014.
- BEIGIER-BOMPADRE, M. *et al.* ***Mycobacterium tuberculosis* infection modulates adipose tissue biology.** *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 10, p. 1–24, 2017.
- BERG, A. H. *et al.* **The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action.** *Nature medicine*, v. 7, n. 8, p. 947–953, 2001.
- BERTOLA, A. *et al.* **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.
- BLIGH EG, DYER WJ. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol*, v. 37, n. 8, p. 911-7, 1959.
- BORAH, K. *et al.* **GSMN-ML-a genome scale metabolic network reconstruction of the obligate human pathogen *Mycobacterium leprae*.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 7, p. 1–20, 2020.
- BOULENOUAR, S. *et al.* **Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity.** *Immunity*, v. 46, n. 2, p. 273–286, 2017.
- BOURGEOIS, C. *et al.* **Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. December, p. 1–25, 2019.
- BROWNE, SG; HOGERZEIL, LM. **“B663” in the treatment of leprosy: preliminary report of a pilot trial.** *Leprosy Review*, v. 33, p. 6–10, 1962.
- CANNON, M. J; SCHMID, D. S.; HYDE, T. B. **Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection.** *Reviews in medical virology*, v. 20, n. 4, p. 202–213. 2010.

- CAO, H. *et al.* **Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism.** *Cell*, v. 134, n. 6, p. 933–944, 2008.
- CASTAN-LAURELL, I. *et al.* **Apelin, diabetes, and obesity.** *Endocrine*, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2011.
- CHAN, J. L. *et al.* **The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p. 1409–1421, 2003.
- CHANDRASEKARAN, P. *et al.* **Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis.** *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 1316, 2017.
- CHATTERJEE, K.R; DAS GUPTA, N.N; DE, M.L. **Electron Microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*.** *Experimental Cell Research*, v. 18, p. 521–527, 1959.
- CHEN, S. X; ZHANG, L-J; GALLO, R. L. **Dermal White Adipose Tissue: A Newly Recognized Layer of Skin Innate Defense.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 5, p. 1002–1009, 2019.
- CHENG, X. *et al.* **Adiponectin Induces Pro-inflammatory Programs in Human Macrophages and CD4+ T Cells.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 44, p. 36896–36904, 2012.
- CHOI, C. H. J.; COHEN, P. **Adipose crosstalk with other cell types in health and disease.** *Experimental Cell Research*, v. 360, n. 1, p. 6–11, 2017.
- COÍN ARAGÜEZ, L. *et al.* **Thymus fat as an attractive source of angiogenic factors in elderly subjects with myocardial ischemia.** *Age (Dordrecht, Netherlands)*, v. 35, n. 4, p. 1263–1275, 2013.
- COLE, S T *et al.* **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** *Nature*, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.
- COLE, S T *et al.* **Massive gene decay in the leprosy bacillus.** *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1007–11, 2001.
- COLEMAN, R. A.; MASHEK, Douglas G. **Mammalian triacylglycerol metabolism: Synthesis, lipolysis, and signaling.** *Chemical Reviews*, v. 111, n. 10, p. 6359–6386, 2011.
- COMBS, T. P. *et al.* **The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 25, p. 24085–24094, 2005.
- CONTRERAS, N. A. *et al.* **Life-long control of cytomegalovirus (CMV) by t resident memory cells in the adipose tissue results in inflammation and hyperglycemia.** *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 6, p. 1–25, 2019.
- COOK, K S *et al.* **Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve.** *Science*, v. 237, n. 4813, p. 402 LP – 405, 1987.

COPPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. ***In vivo* regulation of lipolysis in humans.** Journal of Lipid Research, v. 35, n. 2, p. 177–193, 1994.

COUTURIER, J. *et al.* **Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4+ T cells and HIV.** AIDS (London, England), v. 29, n. 6, p. 667–674. 2015.

COUTURIER, J.; LEWIS, D.E. **HIV Persistence in Adipose Tissue Reservoirs.** Current HIV/AIDS Reports, v. 15, n. 1, p. 60–71, 2018.

CRUZ, D. *et al.* **Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy.** The Journal of Clinical Investigation, v. 118, n. 8, p. 2917–2928. 2008.

CUI, H. L. *et al.* **HIV protein Nef causes dyslipidemia and formation of foam cells in mouse models of atherosclerosis.** FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 28, n. 7, p. 2828–2839. 2014.

DAMOUCHE, A. *et al.* **Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection.** PLoS Pathogens, v. 11, n. 9, p. 1–28, 2015.

DANIEL, J. *et al.* **Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture.** Journal of bacteriology, v. 186, n. 15, p. 5017–5030, 2004.

DAUMARIE, D. **Implementation of MDT.** WHO. Multidrug therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. Geneva: [s.n.], p. 45–67. 2004.

DENG, T. *et al.* **Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation.** Cell Metabolism, v. 17, n. 3, p. 411–422. 2013.

DOS REIS, S. A. **O tecido adiposo como sítio de infecção por *Mycobacterium leprae*.** 2016. 102p. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro. 2016.

DOS SANTOS, V M *et al.* **Frequency of diabetes mellitus and hyperglycemia in chagasic and non-chagasic women.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, n. 5, p. 489–496, 1999.

DUEWELL, P. *et al.* **NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals.** Nature, v. 464, n. 7293, p. 1357–1361, 2010.

EAPEN, B. R. ***Mycobacterium leprae* genome revisited using the latest bioinformatics tools.** The Gulf Journal of Dermatology & Venereology, v. 9, n. 1, p. 25–27, 2012.

EBKE, L. A. *et al.* **Tight association between macrophages and adipocytes in obesity: Implications for adipocyte preparation.** Obesity, v. 22, n. 5, p. 1246–1255. 2014.

EIDT, L. M. **Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira.** Saúde e Sociedade, v. 13, n. 2, p. 76–88, 2004.

- ELGAZAR-CARMON, V. *et al.* **Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding.** *Journal of lipid research*, v. 49, n. 9, p. 1894–1903. 2008.
- FALUTZ, J. **HIV infection, body composition changes and related metabolic complications: contributing factors and evolving management strategies.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 14, n. 3, p. 255–260. 2011.
- FERRARI, T.C.A. *et al.* **Hepatic involvement in lepromatous leprosy.** *Leprosy Review*, v. 73, n. 1, p. 72-75. 2002.
- FLACHS, P. *et al.* **Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet.** *Diabetologia*, v. 49, n.2, p. 394-397, 2006.
- FOSS, N.T. *et al.* **Hanseníase: Episódios Reacionais.** *Sociedade Brasileira de Hansenologia e de Dermatologia*, s.n., p. 1-19. 2003.
- FRANKE-FAYARD, Blandine *et al.* **Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 32, p. 11468–11473, 2005.
- FRUEBIS, J. *et al.* **Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 4, p. 2005–2010. 2001.
- FRÜHBECK, G. *et al.* **Regulation of adipocyte lipolysis.** [S.l: s.n.], v. 27. 2014.
- FUJISAKA, S. *et al.* **Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice.** *Diabetes*, v. 58, n. 11, p. 2574–2582. 2009.
- FUKUHARA, A. *et al.* **Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin.** *Science*, v. 307, n. 5708, p. 426 LP – 430. 2005.
- GARTON, N. J. *et al.* **Cytological and Transcript Analyses Reveal Fat and Lazy Persister-Like Bacilli in Tuberculous Sputum.** *PLOS Medicine*, v. 5, n. 4, p. e75. 2008.
- GAUDIOT, N *et al.* **Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide.** *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 22, p. 13475–13481. 1998.
- GAUTHIER, M-S. *et al.* **AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance.** *The Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 24, p. 16514–16524. 2008.
- GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. **Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source.** *Cell*, v. 131, n. 2, p. 242–256, 2007.

GILLIS, T. P; SCOLLARD, D. M; LOCKWOOD, D. N. J. **What is the evidence that the putative *Mycobacterium lepromatosis* species causes diffuse lepromatous leprosy?** Leprosy review. England: [s.n.]. 2011

GIORDANO, A. *et al.* **Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis.** Journal of lipid research, v. 54, n. 9, p. 2423–2436. 2013.

GIRALT, M; CEREIJO, R.; VILLARROYA, F. **Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues.** Handbook of Experimental Pharmacology, n. January, p. 251–263, 2015.

GORWOOD, J. *et al.* **Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis.** Aids, v. 33, n. 6, p. 953–964, 2019.

GRANNEMAN, J. G. *et al.* **Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl).** Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 50, p. 34538–34544, 2009.

GRANT, R. *et al.* **Quantification of adipose tissue leukocytosis in obesity.** Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 1040, p. 195–209, 2013.

GRANT, R. W.; DIXIT, Vishwa Deep. **Adipose tissue as an immunological organ.** Obesity, v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015.

GREEN, H; MEUTH, M. **An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture.** Cell, v. 3, n. 2, p. 127–133. 1974.

GREENBERG, A. S. *et al.* **Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 24, p. 12035–12039, 1993.

GRINSPOON, S.; CARR, A. **Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults.** The New England journal of medicine, v. 352, n. 1, p. 48–62, 2005.

GUENIN-MACÉ, L; SIMÉONE, R; DEMANGEL, C. **Lipids of Pathogenic Mycobacteria: Contributions to Virulence and Host Immune Suppression.** Transboundary and Emerging Diseases, v. 56, n. 6-7, p. 255–268, 2009.

GUILHERME, A. *et al.* **Molecular pathways linking adipose innervation to insulin action in obesity and diabetes mellitus.** Nat Rev Endocrinol, v. 15, p. 207–225, 2019.

GUPTA, R.; KAR, H. K.; BHARADWAJ, M. **Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy--a clinic-pathological study.** Leprosy review, v. 83, n. 4, p. 354–362, 2012.

GUZIK, T. J. *et al.* **The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue.** Cardiovascular Research, v. 113, n. 9, p. 1009–1023, 2017.

HAEMMERLE, G. *et al.* **Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis.** The Journal of biological chemistry, v. 277, n. 7, p. 4806–15, 2002.

- HAN, S. Ji *et al.* **White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection.** *Immunity*, v. 47, n. 6, p. 1154- 1168.e6, 2017.
- HAN, X. Y *et al.* **A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy.** *American journal of clinical pathology*, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.
- HAN, X. Y *et al.* **Draft Genome Sequence of New Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis*.** *Genome announcements*, v. 3, n. 3, p. e00513-15, 2015.
- HARWOOD, H. J. **The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis.** *Neuropharmacology*, v. 63, n. 1, p. 57–75, 2012.
- HAZAN, U. *et al.* **Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1?** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 16, n. 10, p. 1254–1256, 2002.
- HIDA, K. *et al.* **Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 30, p. 10610–10615, 2005.
- HO, M; WHITE, N J. **Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria.** *The American journal of physiology*, v. 276, n. 6, p. C1231-42, 1999.
- HONAP, T. P *et al.* ***Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 1, p. e0006190–e0006190, 2018.
- HOPEWELL, P. C. **Overview of Clinical Tuberculosis.** *Tuberculosis*, Wiley Online Books. [S.l: s.n.]. 1994.
- HOUBEN, R. M G J; DODD, Peter J. **The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling.** *PLoS medicine*, v. 13, n. 10, p. e1002152, 2016.
- HSU, D. C. *et al.* **CD4+ Cell infiltration into subcutaneous adipose tissue is not indicative of productively infected cells during acute SHIV infection.** *Journal of Medical Primatology*, v. 46, n. 4, p. 154–157, 2017.
- HUI, X. *et al.* **Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation.** *Cell metabolism*, v. 22, n. 2, p. 279–290, 2015.
- HUNTER, S W; BRENNAN, P J. **A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity.** *Journal of bacteriology*, v. 147, n. 3, p. 728–735, 1981.
- IWABU, M. *et al.* **Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1.** *Nature*, v. 464, n. 7293, p. 1313–1319, 2010.

JAN, V. *et al.* **Altered fat differentiation and adipocytokine expression are inter-related and linked to morphological changes and insulin resistance in HIV-1-infected lipodystrophic patients.** *Antiviral therapy*, v. 9, n. 4, p. 555–564, 2004.

JENKINS, C. M *et al.* **Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities.** *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 47, p. 48968–75, 2004.

JOB, C K. ***Mycobacterium leprae* in nerve lesions in lepromatous leprosy. An electron microscopic study.** *Archives of pathology*, v. 89, n. 3, p. 195–207, 1970.

JOB, C K; CHEHL, S K; HASTINGS, R C. **New findings on the mode of entry of *Mycobacterium leprae* in nude mice.** *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. United States: [s.n.].* 1990.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Tecido Adiposo.** *Histologia Básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 120–124.

KADOWAKI, T. *et al.* **Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.** *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

KAHAWITA, I. P; WALKER, S. L; LOCKWOOD, D. N J. **Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum .** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2008.

KAUR, G.; KAUR, J. **Multifaceted role of lipids in *Mycobacterium leprae*.** *Future Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 315–335, 2017.

KENNEDY, G C. **The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 140, n. 901, p. 578–596, 1953.

KENNEDY, P. G E. **Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness).** *The Lancet Neurology*, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013.

KERN, P. A *et al.* **Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression.** *Diabetes*, v. 52, n. 7, p. 1779–1785, 2003.

KHANDEKAR M, NUUTILA P, SCHAART G, HUANG K, TU H, VAN WD. **Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human.** *Cell*, v.150, n. 2, p. 366-376, 2012.

KNIGHT, S. C. **Specialized perinodal fat fuels and fashions immunity.** *Immunity*, v. 28, n. 2, p. 135–138, 2008.

- KOPP, A. *et al.* **Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes.** *Obesity* (Silver Spring, Md.), v. 17, n. 4, p. 648–656, 2009.
- KOSMISKI, L *et al.* **Fat distribution is altered in HIV-infected men without clinical evidence of the HIV lipodystrophy syndrome.** *HIV Medicine*, v. 4, n. 3, p. 235–240, 2003.
- KRAUSE, B.R.; HARTMAN, A.D. **Adipose tissue and cholesterol metabolism.** *Journal of lipid research*, v. 25, p. 97–110, 1984.
- KUMADA, M. *et al.* **Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages.** *Circulation*, v. 109, n. 17, p. 2046–2049, 2004.
- KURUP, I. G; MAHADEVAN, P R. **Cholesterol metabolism of macrophages in relation to the presence of *Mycobacterium leprae*.** *J Biosci*, v. 4, n. 3, p. 307–316, 1982.
- LAFONTAN, M; BERLAN, M. **Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function.** *Journal of lipid research*, v. 34, n. 7, p. 1057–1091, 1993.
- LAFONTAN, M. *et al.* **Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP.** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 19, n. 4, p. 130–137, 2008.
- LAFONTAN, M.; LANGIN, D. **Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue.** *Progress in Lipid Research*, v. 48, n. 5, p. 275–297, 2009.
- LARGE, V. *et al.* **Metabolism of lipids in human white adipocyte.** *Diabetes and Metabolism*, v. 30, n. 4, p. 294–309, 2004.
- LASS, A. *et al.* **Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome.** *Cell Metabolism*, v. 3, n. 5, p. 309–319, 2006.
- LASTÓRIA, J. C.; DE ABREU, M. A. M. M. **Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.
- LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. **An Integrated View of Immunometabolism.** *Cell*, v. 172, n. 1–2, p. 22–40, 2018.
- LEMES, R.M.R. *et al.* **Altered composition and functional profile of high-density lipoprotein in leprosy patients.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 3, p. 1–23. 2020.
- LI, S. *et al.* **Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.** *JAMA*, v. 302, n. 2, p. 179–188, 2009.
- LIU, J. *et al.* **Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice.** *Nature medicine*, v. 15, n. 8, p. 940–945, 2009.



LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method.** *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO, J. C. *et al.* **Adipsin Is an Adipokine that Improves  $\beta$  Cell Function in Diabetes.** *Cell*, v. 158, n. 1, p. 41–53, 2014.

LOBATO, L. S. *et al.* **Statins increase rifampin Mycobactericidal effect.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 10, p. 5766–5774, 2014.

LORD, G M *et al.* **Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression.** *Nature*, v. 394, n. 6696, p. 897–901, 1998.

LUMENG, C. N; BODZIN, J. L; SALTIEL, A. R. **Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.** *The Journal of clinical investigation*, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

LUO, Y.; LIU, M. **Adiponectin: a versatile player of innate immunity.** *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 2, p. 120–128, 2016.

LUO, Y. *et al.* **The function of peroxisome proliferator-activated receptors PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\delta$  in *Mycobacterium leprae*-induced foam cell formation in host macrophages.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 14, n. 10, p. e0008850, 2020.

LUONG, Q. *et al.* **Deciphering white adipose tissue heterogeneity.** *Biology*, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2019.

MAEDA, N *et al.* **PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein.** *Diabetes*, v. 50, n. 9, p. 2094–2099, 2001.

MARIATHASAN, S. *et al.* **Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP.** *Nature*, v. 440, n. 7081, p. 228–232, 2006.

MARQUES, M. A. M *et al.* **The Essential Role of Cholesterol Metabolism in the Intracellular Survival of *Mycobacterium leprae* Is Not Coupled to Central Carbon.** *Journal of bacteriology*, v. 197, n. 23, p. 3698–3707, 2015.

MARROQUÍ, L. *et al.* **Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways.** *Journal of molecular endocrinology*, v. 49, n. 1, p. R9-17, 2012.

MARTINEZ, A. N. *et al.* **Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, 2009.

MARTINS, A. C. da C. *et al.* **Estudo da mucosa nasal de contatos de hanseníase, com positividade para o antígeno glicolípido fenólico 1.** *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 2010.

MATHIS, D.; SHOELSON, S. E. **Immunometabolism: an emerging frontier.** *Nature reviews. Immunology*. [S.l: s.n.]. 2011.

- MATOS FERREIRA, A. V. *et al.* **Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease.** *Microbes and Infection*, v. 13, n. 12–13, p. 1002–1005, 2011.
- MATTOS, K. A. *et al.* **Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis.** *J. Leukoc. Biol.*, v. 87, n. 3, p. 371–384, 2010.
- MATTOS, K.A. *et al.* **Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes.** *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011a.
- MATTOS, K. A. *et al.* **TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 187, n. 5, p. 2548–2558, 2011b.
- MATTOS, K. A. *et al.* **Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. SUPPL.1, p. 156–166, 2012.
- MATTOS, K. A. *et al.* ***Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment.** *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 6, p. 797–815, 2014.
- MAURIN, T *et al.* **Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes.** *Experimental Cell Research*, v. 304, n. 2, p. 544–551, 2005.
- MERCER, J. G. *et al.* **Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization.** *FEBS Letters*, v. 387, n. 2–3, p. 113–116, 1996.
- MILLER, L. S; CHO, John S. **Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections.** *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 8, p. 505–518, 2011.
- MILLER, L. H. **Distribution of Mature Trophozoites and Schizonts of *Plasmodium Falciparum* in the Organs of *Aotus Trivirgatus*, the Night Monkey.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 6, p. 860–865, 1969.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hanseníase.** Guia de vigilância em saúde. [S.l: s.n.], 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim epidemiológico - Hanseníase.** 2021.
- MISCH, E A *et al.* **Leprosy and the human genome.** *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 74, n. 4, p. 589–620, 2010.
- MIYOSHI, H. *et al.* **Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 105, n. 6, p. 1430–1436, 2008.
- MORRIS, D. L *et al.* **Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4<sup>+</sup> T cells in mice.** *Diabetes*, v. 62, n. 8, p. 2762–2772, 2013.

- MUNIER, S. *et al.* **In vitro infection of human primary adipose cells with HIV-1: a reassessment.** AIDS, v. 17, n. 17, 2003.
- MYNARCIK, D. C *et al.* **Adiponectin and leptin levels in HIV-infected subjects with insulin resistance and body fat redistribution.** Journal of acquired immune deficiency syndromes, v. 31, n. 5, p. 514–520, 2002.
- NAGAJYOTHI, F. *et al.* **Crucial role of the central leptin receptor in murine Trypanosoma cruzi (Brazil strain) infection.** The Journal of infectious diseases, v. 202, n. 7, p. 1104–13, 2010.
- NAGAJYOTHI, F. *et al.* **Response of adipose tissue to early infection with trypanosoma cruzi (Brazil Strain).** Journal of Infectious Diseases, v. 205, n. 5, p. 830–840, 2012.
- NAWROCKI, A. R *et al.* **Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists.** The Journal of biological chemistry, v. 281, n. 5, p. 2654–2660, 2006.
- NAYLOR, C.; PETRI, W A. **Leptin regulation of immune responses.** Trends in Molecular Medicine, v. 22, n. 2, p. 88–98, 2016.
- NEDERGAARD, J.; CANNON, B. **How brown is brown fat? It depends where you look.** Nature Medicine, v. 19, n. 5, p. 540–541, 2013.
- NERY, J. A. C. *et al.* **Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: Uma abordagem prática.** Anais Brasileiros de Dermatologia. [S.l.]: Scielo, 2006.
- NEYROLLES, O. *et al.* **Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence?** PLoS ONE, v. 1, n. 1 e43, 2006.
- NG, V *et al.* **Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae.** Cell, v. 103, p. 511–524, 2000.
- NGUYEN, M T A. *et al.* **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.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 48, p. 35279–35292, 2007.
- NISHIMURA, S. *et al.* **CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity.** Nature medicine, v. 15, n. 8, p. 914–920, 2009.
- NISHIMURA, S.; MANABE, Ichiro; NAGAI, Ryoza. **Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome.** Discovery medicine, v. 8, n. 41, p. 55–60, 2009.
- OHASHI, K. *et al.* **Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype.** The Journal of biological chemistry, v. 285, n. 9, p. 6153–6160, 2010.
- OPROMOLLA, D.V.A. *et al.* **Rifamycin SV in the treatment of lepromatous leprosy.** Leprosy review, v. 36, n. 3, p. 123-131, 1965.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, Antonio Carlos Ceribelli. **A terminologia relativa à hanseníase.** Anais Brasileiros de Dermatologia. 2005.

OUCHI, N. *et al.* **Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages.** Circulation, v. 103, p. 1057–1063, 2001.

OUCHI, N. *et al.* **Adipokines in inflammation and metabolic disease.** Nature reviews. Immunology, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

OZURU, R. *et al.* **Adipose tissue is the first colonization site of *Leptospira interrogans* in subcutaneously infected hamsters.** PLoS ONE, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017.

PAJVANI, U. B. *et al.* **Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin: Implications for metabolic regulation and bioactivity.** Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 11, p. 9073–9085, 2003.

PAL, D. *et al.* **Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance.** Nature Medicine, v. 18, n. 8, p. 1279–1285, 2012.

PARK, H. K.; AHIMA, Rexford S. **Resistin in rodents and humans.** Diabetes & metabolism journal, v. 37, n. 6, p. 404–414, 2013.

PATEL, L. *et al.* **Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators.** Biochemical and biophysical research communications, v. 300, n. 2, p. 472–6, 2003.

PÉREZ-PÉREZ, A. *et al.* **Role of leptin in female reproduction.** Clinical chemistry and laboratory medicine, v. 53, n. 1, p. 15–28, 2015.

PEYRON, P. *et al.* **Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence.** PLoS pathogens, v. 4, n. 11, p. e1000204, 2008.

PINHEIRO, R. O, *et al.* **Innate Immune Responses in Leprosy.** Front. Immunol, v. 9, n. 518, p. 1-15, 2018.

PRASAD, P V S; KAVIARASAN, P K. **Leprosy therapy, past and present: can we hope to eliminate it?** Indian journal of dermatology, v. 55, n. 4, p. 316–324, 2010.

QIAO, L. *et al.* **Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice.** Diabetologia, v. 57, n. 5, p. 1027–1036, 2014.

QUEIROZ, MS; PUNTEL, MA. **Um pouco de história da hanseníase.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

RAOULT, D; MARRIE, T.; MEGE, J. **Natural history and pathophysiology of Q fever.** The Lancet. Infectious diseases, v. 5, n. 4, p. 219–226, 2005.

REES, R. J. W. **The microbiology of leprosy.** Leprosy. Churchill Livingstone, Edinburgh: [s.n.], p. 31–52, 1985.

RIDLEY, D S; JOPLING, W H. **Classification of leprosy according to immunity. A five-group system.** International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

ROBINSON, K.; PRINS, J.; VENKATESH, B.. **Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness.** Critical Care, v. 15, n. 2, p. 1–9, 2011.

ROBINSON, N. *et al.* **Mycobacterial Phenolic Glycolipid Inhibits Phagosome Maturation and Subverts the Pro-inflammatory Cytokine Response.** Traffic, v. 9, n. 11, p. 1936–1947, 2008.

RODRÍGUEZ A, EZQUERRO S, MÉNDEZ-GIMÉNEZ L, BECERRIL S, Frühbeck G. **Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism.** Am J Physiol Endocrinol Metab., v. 309, n. 8, p. E691-714, 2015.

RUIZ-OJEDA, F. J. *et al.* **Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review.** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 7, p. 1–26, 2016.

SAKURAI, I; SKINSNES, O K. **Lipids in leprosy. Histochemistry of lipids in human leprosy.** International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 38, n. 4, p. 389–403, 1970.

SALES, A. M. *et al.* **Progression of leprosy disability after discharge: is multidrug therapy enough?** Tropical medicine & international health : TM & IH, v. 18, n. 9, p. 1145–1153, 2013.

SAMARAS, K. *et al.* **Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy using International Diabetes Foundation and Adult Treatment Panel III criteria: associations with insulin resistance, disturbed body fat compartmenta.** Diabetes care, v. 30, n. 1, p. 113–119, 2007.

SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. J. **HIF-1alpha and infectious diseases: a new frontier for the development of new therapies.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 59, p. e92, 2017.

SAUNDERSON, P.; BIZUNEH, E.; LEEKASSA, R. **Neuropathic pain in people treated for multibacillary leprosy more than ten years previously.** Leprosy Review, v. 79, n. 3, p. 270–276, 2008.

SAVAGE, D B *et al.* **Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans.** Diabetes, v. 50, n. 10, p. 2199–2202, 2001.

SCHÄFFLER, A.; SCHÖLMERICH, J. **Innate immunity and adipose tissue biology.** Trends in immunology, v. 31, n. 6, p. 228–235, 2010.

- SCHELLER, E. L. *et al.* **Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat.** Trends in endocrinology and metabolism: TEM, v. 27, n. 6, p. 392–403, 2016.
- SCHERER, P.E. *et al.* **A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.** Journal of Biological. 270 (45):26746-9. 1995.
- SCHÖN, T. *et al.* **Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions.** The British journal of dermatology, v. 145, n. 5, p. 809–815, 2001.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. **The inflammasomes.** Cell, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.
- SCOLLARD, D. M. *et al.* **The Continuing Challenges of Leprosy.** Clinical Microbiology Reviews, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.
- SHAW, H B. **A Contribution to the Study of the Morphology of Adipose Tissue.** Journal of anatomy and physiology, v. 36, n. Pt 1, p. 1–13, 1901.
- SHEPARD, C C. **The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads of Mice.** The Journal of experimental medicine, v. 112, n. 3, p. 445–54, 1960.
- SHEPARD, C C. **The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy.** International journal of Leprosy, v. 30, p. 10–18, 1962.
- SHEPARD, C C; MCRAE, D H. **A method for counting acid-fast bacteria.** International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association, v. 36, n. 1, p. 78–82, 1968.
- SHI, H. *et al.* **TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.** The Journal of clinical investigation, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.
- SHOEMAKER, J P; HOFFMAN, R V Jr; HUFFMAN, D G. ***Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain.** Experimental parasitology, v. 27, n. 3, p. 403–407, 1970.
- SILICIANO, R. F; GREENE, W. C. **HIV latency.** Cold Spring Harbor perspectives in medicine, v. 1, n. 1, p. a007096, 2011.
- SILVA, D. S. *et al.* **Blood coagulation abnormalities in multibacillary leprosy patients.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2018.
- SMITH, A. J. *et al.* **Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation.** The Journal of biological chemistry, v. 282, n. 44, p. 32424–32432, 2007.
- SPEAKMAN, J. R *et al.* **Set points, settling points and some alternative models: theoretical options to understand how genes and environments combine to regulate body adiposity.** Disease models & mechanisms, v. 4, n. 6, p. 733–745, 2011.

- STOLARCZYK, E. **Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response?** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 37, p. 35–40, 2017.
- STRISSEL, K. J. *et al.* **Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications.** *Diabetes*, v. 56, n. 12, p. 2910–2918, 2007.
- STRYJECKI, C; MUTCH, D M. **Fatty acid–gene interactions, adipokines and obesity.** *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 65, n. 3, p. 285–297, 2011.
- STUEHR, D. J. **Mammalian nitric oxide synthases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1411, n. 2, p. 217–230, 1999.
- TALUKDAR, S. *et al.* **Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase.** *Nature medicine*, v. 18, n. 9, p. 1407–1412, 2012.
- TAN, B. K; ADYA, R.; RANDEVA, H. S. **Omentin: A Novel Link Between Inflammation, Diabetes, and Cardiovascular Disease.** *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 20, n. 5, p. 143–148, 2010.
- TANG, C-H. *et al.* **Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway.** *Journal of immunology*, v. 179, n. 8, p. 5483–5492, 2007.
- TANOWITZ, H B. *et al.* **Chagas' disease.** *Clinical microbiology reviews*, v. 5, n. 4, p. 400–419, 1992.
- TANOWITZ, H. B. *et al.* **Trypanosoma cruzi infection in diabetic mice.** *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 1, p. 90–93, 1988.
- TRINDADE, S. *et al.* **Trypanosoma brucei Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice.** *Cell Host & Microbe*, p. 1–12, 2016.
- TSATSANIS, C *et al.* **Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli.** *Biochemical and biophysical research communications*, v. 335, n. 4, p. 1254–1263, 2005.
- TVERDAL, A. **Body mass index and incidence of tuberculosis.** *European journal of respiratory diseases*, v. 69, n. 5, p. 355–362, 1986.
- VANDANMAGSAR, B. *et al.* **The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance.** *Nature medicine*, v. 17, n. 2, p. 179–188, 2011.
- VAUGHAN, M; BERGER, J E; STEINBERG, D. **Hormone-Sensitive Lipase And Monoglyceride Lipase Activities In Adipose Tissue.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 239, p. 401–409, 1964.
- VAUGHAN, M.; STEINBERG, D. **Effect of hormones on lipolysis and esterification of free fatty acids during incubation of adipose tissue *in vitro*.** *Journal of Lipid Research*, v. 4, n. 2, p. 193–199, 1963.

VILLENA, J. A. *et al.* **Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 45, p. 47066–75, 2004.

VIRCHOW, R. *Die krankhaften Geschwülste: dreissig Vorlesungen, gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin*, v. 2, 1865.

VOSKUIL, M. I. *et al.* **Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes.** *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, v. 84, n. 3–4, p. 256–262, 2004.

WEI, Q. *et al.* **Adiponectin is required for maintaining normal body temperature in a cold environment.** *BMC Physiology*, v. 17, n. 1, p. 8, 2017.

WEIDEMANN, A; JOHNSON, R S. **Biology of HIF-1 $\alpha$ .** *Cell Death & Differentiation*, v. 15, n. 4, p. 621–627, 2008.

WEISBERG, S. P. *et al.* **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEN, H. *et al.* **Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling.** *Nature immunology*, v. 12, n. 5, p. 408–415, 2011.

WEN, J. J. *et al.* **Markers of oxidative stress in adipose tissue during *Trypanosoma cruzi* infection.** *Parasitology research*, v. 113, n. 9, p. 3159–3165, 2014.

WHITEHEAD, J. P. *et al.* **Adiponectin - A key adipokine in the metabolic syndrome.** *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 8, n. 3, p. 264–280, 2006.

WHO. **Chemotherapy of leprosy for control programmes : report of a WHO study group** [meeting held in Geneva from 12 to 16 October 1981]. *World Health Organization technical report series ; no. 675*, 1982, Geneva: World Health Organization, 1982.

WHO. **Leprosy** - Forty-fourth World Health Assembly. 1991.

WHO. **Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy.** *Weekly epidemiological record*, v. 94, n. August 2019, p. 389–412, 2019.

WHO. **WHO Expert Committee on Leprosy** [meeting held in Geneva from 17 to 24 November 1987]: sixth report. *World Health Organization technical report series ; no. 768*, 1988, Geneva: World Health Organization, 1988.

WILAIRATANA, P *et al.* **Prognostic significance of skin and subcutaneous fat sequestration of parasites in severe falciparum malaria.** *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 31, n. 2, p. 203–212, 2000.

WILDER-SMITH, E. P; VAN BRAKEL, W. H. **Nerve damage in leprosy and its management.** *Nature clinical practice. Neurology*, v. 4, n. 12, p. 656–663, 2008.



WILLIAMS, D. L. *et al.* **Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection.** Journal of molecular microbiology and biotechnology, v. 8, n. 1, p. 58–72, 2004.

WINER, D. A. *et al.* **B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies.** Nature medicine, v. 17, n. 5, p. 610–617, 2011.

WU, D. *et al.* **Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis.** Science (New York, N.Y.), v. 332, n. 6026, p. 243–247, 2011.

XU, H. *et al.* **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** The Journal of Clinical Investigation, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 2003.

YAMAUCHI, T. *et al.* **The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity.** Nature Medicine, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001.

YANG, Q. *et al.* **Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes.** Nature, v. 436, n. 7049, p. 356–362, 2005.

YANG, R-Z. *et al.* **Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action.** American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 290, n. 6, p. E1253–E1261, 2006.

YEAMAN, S. J. **Hormone-sensitive lipase - new roles for an old enzyme.** Biochemical Journal, v. 379, n. 1, p. 11–22, 2004.

YESSOUFOU, A; WAHLI, W. **Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels.** Swiss medical weekly, v. 140, p. w13071, 2010.

YOUN, S-S. *et al.* **Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes.** Diabetes, v. 57, n. 2, p. 372–377, 2008.

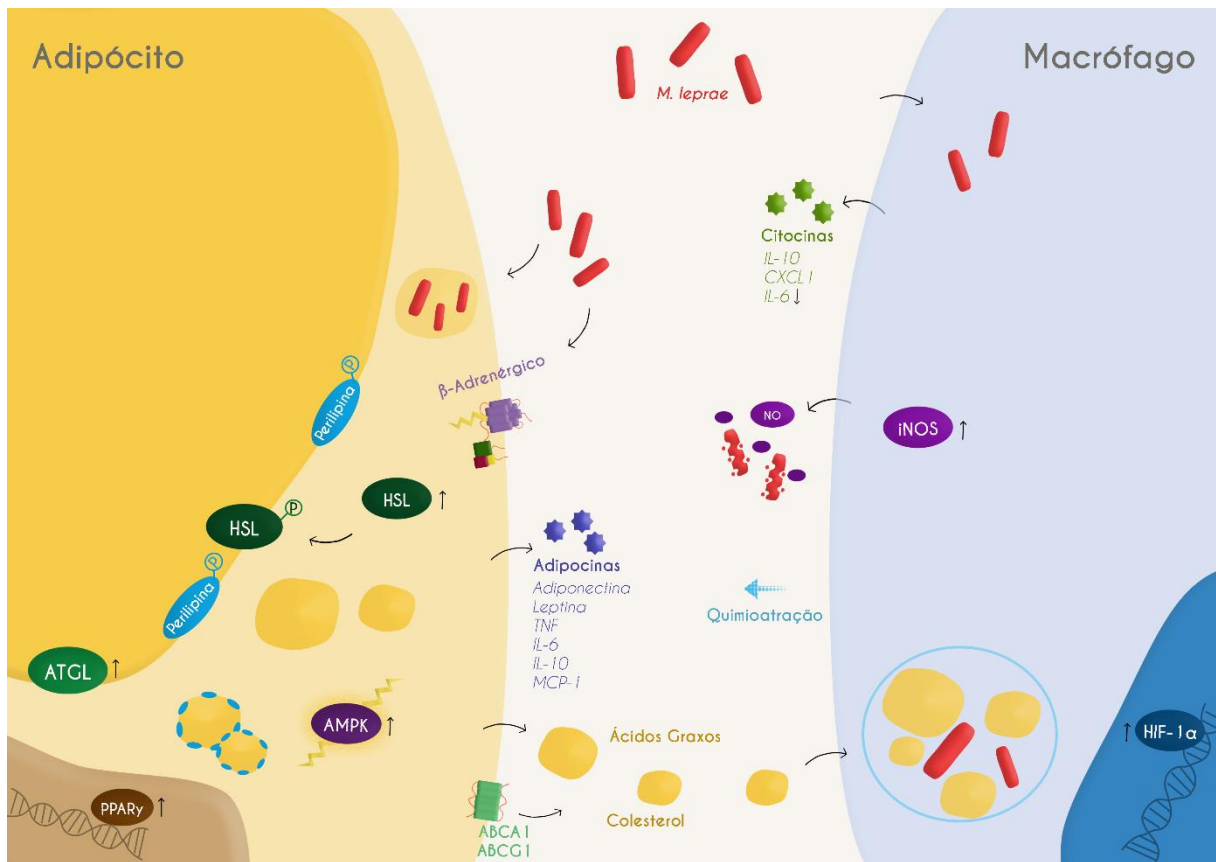
ZHANG, L. J. *et al.* **Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection.** Science, v. 347, n. 6217, p. 67–71, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** Nature, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1994.

ZHOU, R. *et al.* **Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation.** Nature immunology, v. 11, n. 2, p. 136–140, 2010.

ZIMMERMANN, R. *et al.* **Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.** Science (New York, N.Y.), v. 306, n. 5700, p. 1383–6, 2004.

## ANEXO I - Representação esquemática da hipótese do modelo estudado no trabalho.



Após nosso estudo propomos que a partir da exposição dos adipócitos ao *Mycobacterium leprae*, ocorre o estímulo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que por sua vez ativam o processo de lipólise da célula hospedeira, estimulando a ação da enzima lipase de triacilglicerídeos de tecido adiposo (ATGL) bem como da lipase hormônio sensível (HSL), que catalisam a quebra de triacilglicerídeos a ácidos graxos livres e glicerol. O aumento do efluxo de colesterol para o meio extracelular ocorre a partir da maior disponibilidade dos receptores responsáveis pelo translocamento da molécula pela membrana celular (ABCG1 e ABCA1). Os níveis do fator de transcrição PPAR $\gamma$  aumentados indicam que, apesar do estímulo lipolítico, o adipócito mantém seu metabolismo ativo para a formação de novos corpúsculos, auxiliado pelo aumento dos níveis de perilipinas nas células. A ativação da enzima AMPK nos indica que a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos livres provavelmente está ativa. O ambiente intracelular dos adipócitos, por sua vez, poderia representar um ambiente favorável para a sobrevivência e persistência de *M. leprae* por longos períodos de tempo por oferecer substratos e maquinaria para modulação lipídica que beneficiariam sua nutrição. A infecção dos adipócitos também pode interferir na resposta de macrófagos residentes do tecido adiposo, através da liberação de adipocinas como a MCP-1, contribuindo para alterações na imunorregulação durante a infecção. Além disso, a liberação de lipídeos pode contribuir para a formação de macrófagos espumosos, um fenótipo reconhecidamente permissivo à infecção, com aumento na expressão de IL10 e redução na expressão de IL6.