



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA

Universidad Jesuita

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Químicas

“Impacto de la infección con *Trypanosoma cruzi* y la nutrición sobre la expresión de receptores innatos y parámetros inmuno-metabólicos en un modelo de obesidad”

Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de Doctor en Bioquímica

María Eugenia CABALÉN

Córdoba, 2015



UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA
Universidad Jesuita



DIRECTOR: Prof. Dra CANO Roxana C. (PhD). Facultad de Ciencias Químicas, UA
Área CS. AGR. ING. BIO Y S CONICET. Universidad Católica de Córdoba, Córdoba.

CO-DIRECTOR: Prof. Dra. GEA Susana (PhD). Depto. de Bioquímica Clínica Facultad
de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, CIBICI-CONICET.

COMISIÓN ASESORA

Dr. BAIARDI Gustavo (PhD). Laboratorio de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias
Químicas, UCC. IIByT-CONICET.

Dr. BELTRAMO Dante (Ph D). Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba
(CEPROCOR). Facultad de Ciencias Químicas, UCC.

Dra. STUZZ Graciela (PhD). Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias
Médicas, UNC.

TRIBUNAL EXAMINADOR

Prof. Dra. PERDIGON Gabriela (Ph D). Investigadora Superior del CONICET. Centro de
Referencia para Lactobacilos, CERELA-CONICET, Tucumán.

Dr. BAIARDI Gustavo (PhD). Laboratorio de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias
Químicas, UCC. IIByT-CONICET.

Prof. Dra. STUZZ Graciela (PhD). Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias
Médicas, UNC.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL EXAMINADOR

Firma y aclaración

Firma y aclaración

Firma y aclaración

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado especialmente a tres personas que marcaron mi vida de diferentes formas.

A mi abuelo vasco, quien desde donde está, siempre me da las fuerzas necesarias para continuar en el camino de la vida y me enseñó que son tres los pilares fundamentales para poder conseguir las metas que uno se propone: el amor y pasión por lo que uno hace, la perseverancia y la humildad.

A mi directora de tesis, quien me transmitió la pasión por la ciencia y sus valores personales y profesionales y me acompañó a la par en este hermoso camino recorrido.

A mi compañero de vida, mi esposo y amigo, quien a diario me enseña la importancia del amor para honrar la vida.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me acompañaron en este largo camino recorrido.

Principalmente a mi familia, por ser un pilar fundamental en mi vida y muy especialmente a mis padres, por darme la educación y el amor incondicional necesarios para poder crecer tanto personal como profesionalmente. Por comprenderme, ayudarme y por sobre todo, acompañarme. A mis hermanos, de quien aprendo todos los días las pequeñas y grandes cosas de la vida. A mis abuelos, quienes me recuerdan constantemente los valores de la vida y quienes me transmiten la sabiduría de la experiencia.

A mis amigas y amigos de la vida, los eternos y los más nuevos, que representan la familia que uno elige.

A mi directora, Roxi, quien me abrió las puertas en este camino, quien me acompañó y me sostuvo de pie con esa mirada que me mostraba que todo se podía conseguir, con esfuerzo y alegría.

A mi co-directora, Susi, porque estuvo a mi lado y me transmitió su conocimiento y pasión por la ciencia.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba, por mi formación como **profesional de ciencia, conciencia y compromiso** y permitirme continuar y lograr mi formación académica de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), por la beca otorgada para mi formación doctoral.

A los miembros de la comisión de tesis Dres: Gustavo Baiardi, Dante Beltramo y Graciela Stutz, por brindarme su experiencia, valiosos aportes y sugerencias en la realización y corrección de este trabajo de tesis.

A la Dra. Sara Palacios por su dedicación y compromiso como directora de la Carrera Doctoral de nuestra facultad.

Muchas gracias a las autoridades y al equipo de trabajo de la Facultad de Ciencias Químicas, por acompañarme y permitir la realización de esta tesis.

A las Dras. Patricia Bozza y Clarissa Maya-Monteiro, por permitirme hacer una pasantía en su Laboratorio de Inmunofarmacología (Fiocruz, Brasil) y por su inmensa generosidad. Porque me abrieron las puertas y me hicieron sentir “como en casa”, porque me permitieron crecer a su lado y formar parte de su prestigioso grupo. Por sobre todo a mi hermana brasilera, Sally, quien me hizo sentir querida, acompañada y me entregó una amistad incondicional.

Y en especial a Juan, mi esposo, compañero y amigo... simplemente por hacerme inmensamente feliz y por regalarme lo mejor que me puede haber dado la vida...

Muchas gracias...

TRABAJOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

María E. Cabalén; María F. Cabral; Liliana M. Sanmarco; Marta C. Andrada; Luisina I. Onofrio; Nicolás E. Ponce; María P. Aoki; Susana Gea; Roxana C. Cano. "Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model".

Enviado junio 2015, manuscrito número 005776. Revista Oncotarget (Immunology). Estado: Bajo revisión.

Onofrio LI, Arocena AR, Paroli AF, **Cabalén ME**, Andrada MC, Cano RC, Gea S. "*Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders". PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb 10;9 (2).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ác.E	Ácido esteárico
Ac.O	Ácido oleico
Ac.P	Ácido palmítico
Amb	Ambiente
AMPK	Proteín quinasa activada por AMP
AP-1	Proteína activadora-1
ApoB100	Apolipoproteína B100
ApoE	Apolipoproteína E
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Carbonos
CD36	Receptor <i>cluster</i> de diferenciación 36
CLS	Estructuras tipo corona
CO ₂	Dióxido de carbono
CRP	Proteína C reactiva
CTRP	Cartonectina
d	Día
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DHA	Ácido docosahexaenoico
DIO	Obesidad inducida por dieta
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
FFA	Ácidos grasos libres
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRP120	Receptor 120 acoplado a proteína G
hs	Horas
H ₂ O mQ	Agua miliQ
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H&E	Hematoxilina y eosina
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFD	Dieta rica en grasa
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana

HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina
HRP	Peroxidasa de rabanito
IBMX	Isobutilmetilxantina
IgG	Inmunoglobulina G
IKK β	Inhibidor del factor <i>kappa-B</i> subunidad beta
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INF	Interferón
IR	Insulino Resistencia
IRFs	Factores reguladores de interferon
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	Lipopolisacárido
M Φ	Macrófagos
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MCP1/CCL2	Proteína quimioattractante de monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MDA	Malondialdehído
MID	Medio de inducción de diferenciación
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
Min	Minutos
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MM1	Medio de maduración 1
MTP	Proteína microsomal de transporte de triglicéridos
MyD88	Factor de diferenciación mieloides 88
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NF- κ B	Factor nuclear kappa beta
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NK	Asesinas naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PFA	Proteínas de fase aguda

PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PKC	Proteín quinasa C
PLIN1	Perilipina 1
PLIN2/ADRP	Perilipina 2/ adipofilina
PPARs	Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas
PPAR γ	Receptor activador de la proliferación de peroxisoma gamma
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PS	Penicilina-estreptomicina
Rab-5	<i>Ras-related protein in brain-5</i>
RI	Receptor de insulina
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rpm	revoluciones por minute
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estandar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpatico
SOCS3	Supresor de señalización de citocina 3
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STZ	Estreptozotocina
SVF	Fracción estromal vascular
TA	Tejido adiposo
TAE	Tejido adiposo epicárdico
TAP	Tejido adiposo perivascular
TAV	Tejido adiposo visceral
TG	Triglicéridos
Th1	<i>Helper</i> tipo 1
Th2	<i>Helper</i> tipo 2
TLR	Receptores tipo <i>toll</i>
TLR2	Receptor tipo <i>toll</i> 2
TLR4	Recetor tipo <i>toll</i> 4
TMP	Tetrametoxipropano
TNF α	Factor de necrosis tumoral alpha
T $^{\circ}$	Temperatura
TTBS	<i>Buffer</i> salino de tris y <i>tween</i> 20
v/ vol	Volumen/ volúmenes

VCAM-1	Molécula de adhesión de células vascular-1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Veh	Vehículo
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
vs.	Versus

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS.....vii

RESUMEN/SUMMARY.....19

1. INTRODUCCIÓN.....21

INTRODUCCIÓN GENERAL.....22

1.1 PRIMERA PARTE. LA OBESIDAD.....23

1.1.1 Obesidad: Epidemia del Siglo XXI

1.1.2 Obesidad y patologías inflamatorias asociadas

1.1.2.1 Resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo 2

1.1.2.2 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

1.1.2.3 La enfermedad cardiovascular. Aterosclerosis

1.2 SEGUNDA PARTE. TEJIDO ADIPOSO31

1.2.1 El tejido adiposo. Clasificación

1.2.1.1 Adipocinas

1.2.2 Composición celular del tejido adiposo

1.2.2.1 Adipocitos

1.2.2.2 Macrófagos en el tejido adiposo

1.2.3 Expresión de receptores de la inmunidad innata en el tejido adiposo

1.2.3.1 Receptores tipo *toll*

1.2.3.2 Receptores basureros o *scavenger*

1.3 TERCERA PARTE. Enfermedad de Chagas.....46

1.3.1 El agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

1.3.1.1 Ciclo de vida

1.3.1.2 Progresión clínica de la enfermedad de Chagas	
1.3.2 El tejido adiposo en la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	
1.3.3 La inmunidad innata en la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	
2. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	51
2.1. Antecedentes e hipótesis.....	51
2.2 Objetivos.....	54
2.2.1 Objetivo general	
2.2.2 Objetivos específicos	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.1 Modelo de obesidad e infección <i>in vivo</i>	56
3.1.1 Diseño experimental y tratamiento	
3.1.2 Parámetros morfométricos	
3.1.3 Muestras bioquímicas	
3.1.3.1 Determinaciones bioquímicas: medición de glucosa e insulina	
3.1.3.2 Determinaciones bioquímicas: medición de los lípidos plasmáticos	
3.1.3.3 Determinaciones bioquímicas: alanina aminotransferasa (ALT)	
3.1.4 Apolipoproteína apoB100	
3.1.5 Perfil de lipoproteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida	
3.2 Cultivo celular de adipocitos 3T3-L1 y tratamiento.....	61
3.2.1 Protocolo de diferenciación celular y diseño experimental	
3.2.2 Protocolo de tratamiento con ácidos grasos e infección con <i>T. cruzi</i>	
3.3 Proteínas del perfil inflamatorio y anti-inflamatorio.....	62
3.3.1 Citocinas y adipocinas	
3.3.2 Proteínas de fase aguda	
3.3.3 Western Blot	
3.4 Medición de triglicéridos en hígado.....	66
3.5 Determinación de malondialdehído.....	66
3.6 Citometría de flujo.....	67
3.6.1 Aislamiento de la fracción estromal vascular	
3.6.2 Citometría de Flujo de la fracción estromal vascular	

3.7 Estudios de microscopía.....	68
3.7.1 Hematoxilina y eosina	
3.7.2 Inmunofluorescencia	
3.8 Estudio de corpúsculos lipídicos.....	69
3.8.1 Tinción con oil-red O	
3.8.2 Tinción con Bodipy	
3.8.3 Extracción de lípidos neutros	
3.9 Análisis estadístico.....	70
4. RESULTADOS.....	71
ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	72
4.1 EFECTO DE LA INFECCIÓN CON <i>Trypanosoma cruzi</i> EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA.....	73
4.1.1 Impacto de la infección con <i>T. cruzi</i> y la dieta en el desarrollo de obesidad e insulino resistencia, efectos metabólicos y alteraciones cardiovasculares	
4.1.1.1 Parámetros morfométricos	
4.1.1.2 Efecto de la señalización de TLR4 sobre los parámetros morfométricos en el modelo de obesidad e infección	
4.1.1.3 Estudio del metabolismo de glúcidos e insulino resistencia periférica	
4.1.1.4 Efecto de la infección parasitaria y la dieta sobre el metabolismo de lípidos y las alteraciones cardiovasculares	
4.1.1.5 Efecto de la señalización de TLR4 en la homeostasis metabólica de la glucosa y lípidos	
4.1.1.6 Efecto de la infección con <i>T. cruzi</i> y la dieta sobre el desarrollo de alteraciones hepáticas	
4.1.1.7 Efecto de la infección con <i>T. cruzi</i> y la dieta sobre el desarrollo de alteraciones hepáticas en animales TLR4 -/-	
4.1.2 Estudio de receptores de la inmunidad innata y caracterización de macrófagos infiltrantes en TAV	
4.1.2.1 Efecto de la infección con <i>T. cruzi</i> y la dieta sobre la histomorfología del TAV, la expresión local de receptores TLR2 y CD36 y la peroxidación lipídica	
4.1.2.2 Efecto de la presencia del parásito y la dieta en el fenotipo de macrófagos infiltrantes y la producción intracelular de MCP1 en TAV	

4.1.3. Estudio de la respuesta inflamatoria sistémica en el modelo crónico de obesidad e infección con *T. cruzi*

4.1.3.1 Desbalance en la producción de citocinas y adipocinas

4.1.3.2 Proteínas de fase aguda sistémicas

4.1.3.3 Efecto de la respuesta inflamatoria sobre la parasitemia y sobrevida de los animales infectados

ESTUDIOS *IN VIVO*.....98

4.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi* Y EL TRATAMIENTO CON ÁCIDOS GRASOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADIPOCITOS 3T3-L199

4.2.1 Efecto de la concentración de ácidos grasos sobre la lipotoxicidad y viabilidad celular

4.2.2 Estudio de la influencia de *T. cruzi* y ácidos grasos sobre la expresión basal y post estímulo del receptor CD36

4.2.3 Estudio de la influencia de *T. cruzi* y ácidos grasos sobre la respuesta inflamatoria de la célula adiposa

4.2.3.1 Producción de citocinas pro-inflamatorias

4.2.3.2 Expresión del factor de transcripción anti-inflamatorio PPAR γ

4.2.4 Efecto de la infección con *T. cruzi* y ácidos grasos en la modulación de corpúsculos lipídicos en la célula adiposa

4.2.4.1 Estudio de corpúsculos lipídicos

4.2.4.2 Expresión de ADRP en células adiposas

4.2.4.3 Estudios preliminares sobre la expresión de ADRP y PPAR γ en preadipocitos 3T3-L1

5. DISCUSIÓN.....113

6. CONCLUSIÓN.....128

7. BIBLIOGRAFÍA.....130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El factor de transcripción NF- κ B media la inflamación e insulino resistencia asociadas a la obesidad.

Figura 2. Metabolismo hepático de fructosa: un mecanismo altamente lipogénico.

Figura 3. Mecanismos etiopatogénicos del síndrome metabólico.

Figura 4. Células y mediadores inflamatorios implicados en la obesidad.

Figura 5. La acción central de la leptina participa en la homeostasis de la glucosa en diferentes tejidos periféricos.

Figura 6. Representación esquemática de los principales agentes infecciosos en la célula adiposa y las adipocinas mayormente involucradas en la respuesta a la infección local y sistémica.

Figura 7. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas en humanos.

Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental *in vivo* con ratones salvajes C57BL/6.

Figura 9. Esquema representativo del diseño experimental para células adiposas 3T3-L1.

Figura 10. Efectos de la obesidad inducida por dieta y la infección con *T. cruzi* sobre: A) peso corporal, B) diámetro de cintura, C) índice de masa corporal, D) contenido de tejido adiposo visceral.

Figura 11. Perfil cualitativo de ácidos grasos plasmáticos por cromatografía gaseosa en grupos: DC (control), DO (dieta obesogénica) y DO+I (dieta obesogénica + *T. cruzi*), a las 24 semanas.

Figura 12. Efecto de la ausencia de TLR4 en el modelo de obesidad e infección con *T. cruzi* sobre: A) el peso corporal y B) la variación de tejido adiposo visceral.

Figura 13. Influencia del tratamiento obesogénico y la infección con *T. cruzi* sobre el metabolismo de glúcidos e insulino resistencia periférica.

Figura 14. Efecto de la dieta y la infección con *T. cruzi* sobre las alteraciones lipídicas y lipoproteicas en el modelo crónico de obesidad.

Figura 15. Microfotografías de tejido cardíaco coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección).

Figura 16. Microfotografías de aorta torácico abdominal con H&E de animales: DC (control), DO (dieta), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección).

Figura 17. Efecto de la ausencia de señalización de TLR4 en el modelo de obesidad e infección sobre los niveles plasmáticos de: (A) glucosa, (B) triglicéridos, (C) colesterol total y (D) apoB100.

Figura 18. Microfotografías de tejido hepático coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección).

Figura 19. Parámetros de injuria hepática.

Figura 20. Efecto de la ausencia de TLR4 sobre los niveles de: (A) triglicéridos obtenidos por gramo de tejido hepático y (B) actividad de ALT.

Figura 21. Microfotografías de tejido adiposo visceral coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección).

Figura 22. Expresión proteica de TLR2 en tejido adiposo visceral a las 24 semanas.

Figura 23. Expresión proteica de CD36 en tejido adiposo visceral a las 24 semanas.

Figura 24. Efecto de la dieta y la infección con *T. cruzi* sobre el nivel de malondialdehído (MDA) en tejido adiposo visceral de animales DC, DO, DO+I y DC+I.

Figura 25. Producción de MCP1 y caracterización del fenotipo de macrófagos infiltrantes por citometría de flujo en tejido adiposo visceral a las 12 semanas.

Figura 26. Influencia de la dieta y la infección sobre la respuesta inflamatoria sistémica.

Figura 27. Perfil de proteínas plasmáticas inducido por la dieta y / o infección con *T. cruzi*.

Figura 28. Curvas de parasitemia y sobrevida de animales infectados con *T. cruzi*.

Figura 29. Análisis de viabilidad de células diferenciadas 3T3-L1.

Figura 30. Expresión del receptor CD36 en células adiposas 3T3-L1.

Figura 31. Influencia del tratamiento con ácidos grasos y *T. cruzi* sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias a las 24 y 48 hs: (A) IL-6 y (B) TNF α .

Figura 32. Expresión del factor de transcripción PPAR γ en células adiposas 3T3-L1.

Figura 33. Tinción de corpúsculos lipídicos con Bodipy.

Figura 34. Cuantificación de lípidos neutros por extracción con Oil-red-O.

Figura 35. Influencia de la presencia de *T. cruzi* sobre los corpúsculos lipídicos en células adiposas.

Figura 36. Expresión de ADRP en células adiposas 3T3-L1.

Figura 37. Análisis de la expresión de ADRP y PPAR γ en preadipocitos 3T3-L1 por western blot.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación Internacional de rango normal, sobrepeso y obesidad en adultos de acuerdo al valor de IMC.

Tabla II. Participación del tejido adiposo en la respuesta inmune.

Tabla III. Ejemplos de moléculas en tejido adiposo con función dicotómica en metabolismo e inmunidad.

Tabla IV. Composición porcentual de los nutrientes de las dietas utilizadas en los grupos experimentales.

Tabla V. Composición del revelador quimioluminiscente (ECL) para Western Blot.

RESUMEN

La obesidad es una epidemia en curso a nivel mundial, reconocida como una enfermedad inflamatoria de grado bajo, caracterizada por concentraciones incrementadas de un amplio panel de citocinas, quimiocinas y proteínas de fase aguda en circulación. Esta inflamación favorece el desarrollo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares e involucra la activación de células inmunes, principalmente macrófagos (MΦ) y una acumulación excesiva de estas células en el tejido adiposo (TA).

Diversos estudios demostrando el impacto negativo del exceso de adiposidad en la función inmune han sido realizados usando modelos artificiales de obesidad, basados en la administración de dietas con alto contenido lipídico o en modelos genéticamente modificados, dificultando la extrapolación a lo observado en el campo clínico. El TA constituye un reservorio del protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, endémica en Latinoamérica y emergente a nivel mundial. Es conocida la desregulación metabólica de glúcidos y lípidos que el parásito genera en el huésped; sin embargo, su influencia en un contexto nutricional excesivo, ha sido aún poco abordada.

En nuestro trabajo, desarrollamos un modelo de obesidad inducido por dieta moderada en grasas (14%), fructosa (5%) y estreptozotocina (8mg/Kg) en ratones machos C57BL/6 y analizamos el impacto de la infección con *T. cruzi* (500 tripomastigotes, cepa Tulahuen) y la nutrición sobre la respuesta metabólica e inflamatoria, las alteraciones cardiovasculares y hepáticas y el compromiso inmune del TA visceral, hasta las 24 semanas. Observamos incrementos en los parámetros morfométricos y metabólicos: hiperglucemia, insulino resistencia, dislipemia, perfil lipoproteico pro-aterogénico, esteatosis hepática y aumento de lípidos en corazón y aorta, así como, MΦ infiltrantes en TA y aumento sistémico de IL-6 y leptina. El parásito disminuyó el contenido lipídico total, a expensas de un aumento del daño funcional (esteatohepatitis, TA disfuncional), metabólico (diabetes y perfil pro-aterogénico) e inflamatorio local (infiltrado celular) y sistémico (IL-6, TNF- α , MCP1, leptina).

En conclusión, la infección parasitaria disminuye las alteraciones morfométricas asociadas a la obesidad, pero induce una desregulación funcional metabólica merced a la exacerbada respuesta inflamatoria generada, sugiriendo al *T. cruzi* como un factor de riesgo potencial de sus co-morbilidades inflamatorias, tales como, la aterosclerosis y la esteatohepatitis.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*; nutrición; obesidad; inmunometabolismo; inflamación; inmunidad innata; adipocinas.

SUMMARY

Obesity is an ongoing worldwide epidemic, recognized as a low-grade inflammatory disease characterized by increased systemic concentrations of a large panel of cytokines, chemokines, and acute-phase proteins. This inflammation favors the development of metabolic and cardiovascular complications, involves the activation of immune cells, mainly macrophages, and induces the excessive accumulation of inflammatory cells in adipose tissue (AT).

Many studies demonstrating the negative impact of excess adiposity on immune function have focused on the study of artificial metabolic extremes models, employing high fat diets or genetically modified models, which are limited to describe the obesity-metabolic dysfunction that dominate the clinical field. AT represents a reservoir for the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas' disease, endemic for Latin America and now widespread in many countries. Fat and glucose metabolism are interrelated and dysregulated in *T. cruzi* infection; however, parasite influence under an excessive nutritional context, has been poorly explored.

Accordingly, the purpose of this study was to develop an obesity model with administration of a moderate fat diet (14%), fructose in water (5%) and streptozotocin (8mg/Kg) in C57BL/6 male mice, and to analyze the impact of *T. cruzi* infection (500 trypomastigotes, Tulahuen strain) and nutrition interrelation on metabolic and inflammatory response, cardiovascular and hepatic disorders, and visceral AT immune response, for 24 weeks.

Our results showed an increase in morphometric and metabolic parameters, characterized by hyperglycemia, insulin resistance and dyslipidemia; also, a pro-atherogenic lipoprotein profile, hepatic steatosis, cardiac and aortic ectopic lipid deposition, AT macrophage infiltration, and high plasma levels of IL-6 and leptin cytokines. Parasite infection resulted in a decrease in total lipid content; but alternatively, it induced an excessive functional tissue damage (esteatohepatitis, dysfunctional AT) together with metabolic deregulations (diabetes and pro-atherogenic profile) and an exacerbated, local (cell infiltration) and systemic (IL-6, TNF- α , MCP1, leptin) inflammatory response.

Taken together, *T. cruzi* infection improves morphometric parameters associated to obesity but induces a synergistic inflammatory response given by the concomitant presence of diet and infection, resulting on metabolic dysfunction and suggesting this parasite as a potential risk factor for obesity-related inflammatory diseases such as atherosclerosis and esteatohepatitis.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; nutrition; obesity; immunometabolism; inflammation; innate immunity; adipokines.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

El tejido adiposo (TA) como órgano endócrino ha recibido en los últimos años una creciente atención por su contribución a la patogénesis de enfermedades metabólicas, entre ellas, la obesidad. Si bien la etiología de la obesidad es multifactorial, la infección con ciertos patógenos, especialmente virus y bacterias, ha demostrado una asombrosa participación en el incremento de adiposidad. En este contexto, cabe destacar la demostrada asociación entre la infección bacteriana con *Chlamydia pneumoniae* y la obesidad, la aterosclerosis y la enfermedad coronaria en humanos [1]. Sin embargo, el efecto de la infección crónica con protozoos parásitos, principalmente el *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, en el contexto de los desórdenes metabólicos es un campo poco explorado, que ha sido propuesto investigar en los últimos años en el marco de la inmunonutrición [2].

A más de 100 años de su descubrimiento (1909), esta tripanosomiasis es considerada en la actualidad una enfermedad re-emergente en zonas endémicas, y emergente a nivel mundial. Por muchos años, se ha sospechado una vinculación entre la infección parasitaria con *T. cruzi* y diabetes y en este sentido ha habido una importante apreciación de la mayor incidencia de diabetes en la población chagásica.

Existen evidencias de las consecuencias metabólicas que produce la infección por *T. cruzi* en el hospedador; sin embargo, continúa siendo un tópico de relevancia, aún no totalmente dilucidado, su participación en lo que respecta a la patogénesis de enfermedades metabólicas. La inflamación parecería ser el denominador común de las patologías infecciosas, como la enfermedad de Chagas y otras patologías no infecciosas, entre ellas, la obesidad, diabetes y aterosclerosis. La convergencia de ambas situaciones patológicas en el huésped -la situación nutricional que lleva a la obesidad y la presencia de un agente infeccioso- así como la resultante modulación metabólica e inmunológica y la participación del TA en este contexto, es un tópico aún poco explorado, cuya investigación permitiría profundizar en la comprensión de la interrelación en la tríada: **infección, nutrición e inflamación** [3].

1.1 PRIMERA PARTE. LA OBESIDAD

1.1.1 Obesidad: Epidemia del Siglo XXI

La obesidad es considerada actualmente un grave problema de Salud Pública mundial y es reconocida como la enfermedad metabólica de mayor relevancia en el mundo occidental. Su prevalencia está incrementando en la población general y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado para el año 2014 una cantidad mayor a 600 millones de adultos y niños obesos a nivel mundial [4].

Clínicamente, la obesidad se define como una acumulación excesiva o anormal de grasa en el TA y los tejidos periféricos, resultando en el aumento de peso corporal (PC).

El índice de masa corporal (IMC) es el indicador antropométrico más comúnmente utilizado en la clínica para identificar sobrepeso y obesidad en adultos y se calcula como la relación entre el peso corporal en kilos y el cuadrado de su estatura en metros (kg/m^2) [5]. Los criterios para definir obesidad según la OMS se muestran en la tabla I. Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de definir la obesidad es el patrón de distribución del TA, para lo cual, se emplean otros métodos antropométricos como la circunferencia de cintura o el índice cintura/cadera [6].

Considerando lo expresado anteriormente, se ha demostrado que el tipo de localización de tejido graso constituye un factor de riesgo mayor para las anomalías metabólicas vinculadas a la obesidad, que la cantidad absoluta de adiposidad total [7, 8].

De acuerdo al predominio de grasa, la obesidad puede clasificarse como androide o central, cuando predomina la acumulación de grasa a nivel superior (principalmente en la zona abdominal o visceral), o como ginoide o periférica, cuando predomina la acumulación de grasa a nivel inferior (principalmente en cadera, glúteos y muslos).

Diversos estudios han sido coincidentes en describir la acumulación de grasa a nivel visceral como un determinante clave para la ocurrencia de riesgos metabólicos y cardiovasculares, asociados a la obesidad [8-10].

Tabla I. Clasificación Internacional de rango normal, sobrepeso y obesidad en adultos de acuerdo al valor de IMC¹.

Clasificación	IMC (Kg/m²)
Rango normal	18.50 – 24.99
Sobrepeso	≥ 25.00
Pre-obeso	25.00 – 29.99
Obeso	≥ 30.00
Obeso clase I	30.00 – 34.99
Obeso clase II	35.00 – 39.99
Obeso clase III	≥ 40.00

¹Adaptado de la OMS 1995, 2000 y 2015 [4].

1.1.2 Obesidad y patologías inflamatorias asociadas

La obesidad es considerada una patología inflamatoria crónica de grado bajo, con repercusiones sobre la homeostasis metabólica y el balance energético total del organismo. La base inflamatoria y la actividad inmunológica implicadas en la obesidad, aumentan la incidencia de las enfermedades inflamatorias asociadas, incluyendo insulino resistencia (IR) y diabetes, hígado graso, aterosclerosis, inflamación de las vías respiratorias y algunos tipos de cáncer, principalmente gastro-intestinales y hepático [11, 12].

1.1.2.1 Resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo 2

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico caracterizado por un cuadro de hiperglucemia en un contexto de resistencia a la acción de la insulina (falta relativa de esta hormona). La resistencia a la insulina es una condición, que se define clínicamente, como la incapacidad de la insulina -producida por el páncreas- para ejercer su acción biológica en los órganos blanco, como hígado, TA y músculo esquelético.

En un estado de IR existe, por lo tanto, ausencia o baja cantidad de incorporación de glucosa en las células blanco con la consecuente alteración en la homeostasis metabólica de glúcidos, lípidos y proteínas.

Como un mecanismo compensatorio para regular los niveles incrementados de glucosa en sangre, las células beta (β) del páncreas se ven forzadas a producir niveles cada vez más elevados de insulina (hiperinsulinemia compensatoria), que pueden resultar en el agotamiento de estas células y el consecuente desarrollo de DM2 [13].

La glucotoxicidad –dada por la hiperglucemia-, la lipotoxicidad –dada por el incremento de ácidos grasos libres (FFA) circulantes- y la endotoxemia –dada por cantidades altas de lipopolisacáridos (LPS) circulantes- son factores claves, actualmente reconocidos, en la patogénesis de IR y/o DM2 asociadas a la obesidad [8]. En relación a este último aspecto, se conoce que el LPS, también llamado endotoxina, tiene una alta afinidad por los quilomicrones y puede atravesar la mucosa intestinal y llegar a circulación. Desde allí, alcanza diversos tejidos, incluyendo TA, hígado y músculo, donde despliega mecanismos inflamatorios mediados por el receptor tipo *toll* 4 (TLR4) [14], contribuyendo al desarrollo de insulino resistencia.

El estrés oxidativo juega un rol crucial en estas patologías. Diversos estudios han demostrado que los pacientes con DM2 presentan una incrementada producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), debido fundamentalmente a los niveles elevados de glucosa y FFA circulantes en estos pacientes [13, 15].

Houstis y col. (2006), comprobaron en dos modelos celulares de insulino resistencia, uno inducido mediante el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y el otro por dexamentasona, que los niveles incrementados de ROS son desencadenantes claves para establecer la patogenia de este estado [16].

Además, se postula que el incremento en el proceso de autofagia, observado en adipocitos insulino resistentes, podría ser un mecanismo central asociado a la lipotoxicidad celular característica de la obesidad [17].

Por otra parte, Hotamisligl y col. (1993), fueron los primeros en demostrar que la citocina pro-inflamatoria TNF α era capaz de inducir resistencia a la acción de la insulina en adipocitos [18]. Posteriormente, las investigaciones se focalizaron en el estudio de los mecanismos intracelulares responsables de esta condición. En este aspecto, evidencias demuestran que la fosforilación de los residuos serina del sustrato del receptor de insulina (IRS) por acción directa de citocinas pro-inflamatorias y/o la activación de los mecanismos de señalización de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) e I-kappa B quinasa/ factor nuclear $\kappa\beta$ (IKK β /NF- κ B) en adipocitos, hepatocitos y macrófagos, son responsables, al menos en parte, de la disminución de sensibilidad a la insulina [19] (Figura 1).

Se postula que dicha activación se puede desencadenar por: i) la acción directa de citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α e interleucina 6 (IL-6) [8]; ii) la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los TLR [14]; iii) la presencia de ROS [15, 16] y iv) algunos agentes infecciosos [20].

Específicamente para TLR4, diversos estudios experimentales han demostrado que la deficiencia de este receptor protege a los animales de la IR y reduce la acumulación de TA visceral (TAV), la esteatosis hepática y la inflamación vascular, después de la administración de una dieta rica en grasa (HFD) [21].

En la actualidad se considera que la resistencia crónica a la insulina es la característica común de un gran número de enfermedades metabólicas con base inflamatoria, entre ellas, la obesidad -tópico de interés en este estudio-, DM2, dislipemias, hipertensión arterial y las enfermedades cardiovasculares.

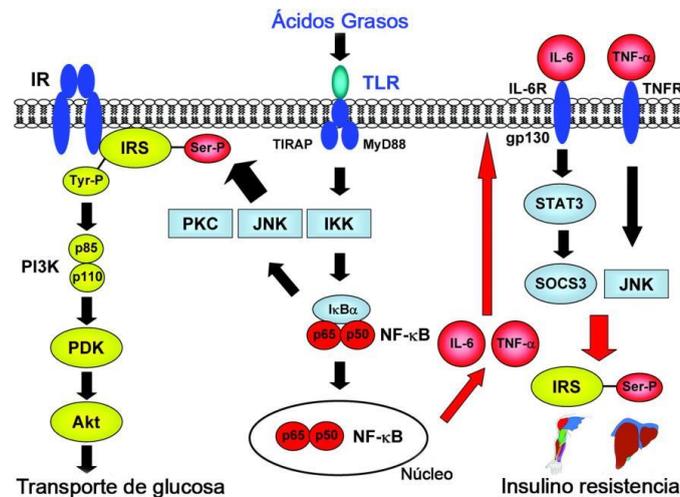


Figura 1. El factor de transcripción NF-κB media la inflamación e insulino resistencia asociadas a la obesidad.

NF-κB factor nuclear κB; IR, receptor de insulina; IRS, sustrato del receptor de insulina; Ser-P, serina fosforilada; Tyr-P, tirosina fosforilada; TLR, receptor tipo toll; TIRAP, proteína adaptadora con dominio TIR; MyD88, factor de diferenciación mieloide 88; IL-6, interleucina 6; IL-6R, receptor de IL-6; TNF-α, factor de necrosis tumoral alpha; TNFR, receptor de TNF; gp-130, glicoproteína 130; PKC, proteína quinasa C; JNK, c-Jun N-terminal quinasa; PI3K, fosfoinositol 3 quinasa; IKK/IκB, inhibidor del factor kappa B quinasa subunidad beta; SOCS3, supresor de señalización de citocina 3; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; PDK, piruvato deshidrogenasa quinasa; Akt, serina/treonina proteína quinasa. Imagen adaptada de Kim, JK. *Endothelial Nuclear Factor κB in Obesity and Aging*, 2012 [22].

1.1.2.2 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad del hígado graso no-alcohólico (NAFLD) representa un amplio espectro de afecciones hepáticas crónicas asociadas a la obesidad, usualmente: hígado graso no alcohólico (o esteatosis simple), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis y cirrosis. Mientras la esteatosis simple se caracteriza por la acumulación hepática de triglicéridos, sin presencia de focos inflamatorios o fibrosis detectables a nivel local; en NASH, la esteatosis se acompaña de una fuerte inflamación hepática y de probable fibrosis [23]. En términos generales, la esteatosis es el resultado de múltiples defectos en la síntesis, secreción y aclaramiento de lípidos y la consecuente desregulación lipídica.

Se ha demostrado que la mayor parte de los triglicéridos acumulados en pacientes con NAFLD (50-70%) provienen de los FFA que llegan al hígado transportados por vía portal. Asimismo, la síntesis de triglicéridos *de novo* está incrementada en tejido hepático de pacientes con esteatosis, favoreciendo adicionalmente al depósito ectópico de lípidos en este órgano. También se ha observado una secreción hepática aumentada de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en pacientes con NAFLD [24].

Estudios recientes apoyan que la alteración en el proceso de autofagia a nivel hepático, puede estar asociado al desarrollo de esteatosis hepática [17].

Los mecanismos patogénicos involucrados en NAFLD parecen ser multifactoriales y complejos y aún no están totalmente dilucidados, aunque existen evidencias en humanos y animales que indican una relación clara entre la IR y/o la resistencia a la leptina y la progresión a NAFLD [25, 26].

Fishman y col. (2007) reportaron a nivel experimental en ratones, una acción directa de la leptina sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos en hígado, a través del mecanismo celular mediado por PI3K [27].

El consumo de fructosa ha sido vinculado al desarrollo de NAFLD (Figura 2), siendo escasos los estudios que avalan una asociación clínica entre el consumo de este azúcar y el desarrollo de esta patología. En este sentido, experimentos en ratones demostraron que la administración de una cantidad alta de fructosa (30-50%), resulta en hipertrigliceridemia, incremento de adiposidad central e insulino resistencia [28, 29].

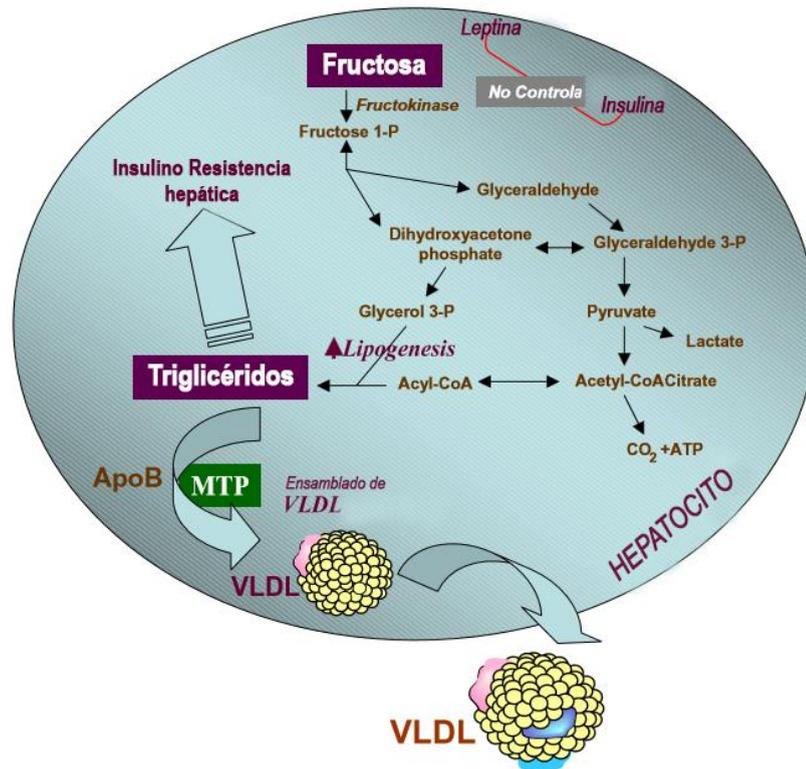


Figura 2. Metabolismo hepático de la fructosa: un mecanismo altamente lipogénico. MTP, proteína microsomal de transporte de triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; ApoB, apolipoproteína B; CO₂, dióxido de carbono; ATP, adenosín trifosfato; Acyl-CoA, acil coenzima A. Imagen tomada de Heather B, Lisa F y Khosrow A. *Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. Nutrion and Metabolism. 2005; 2:1-14* [28].

Evidencias epidemiológicas, bioquímicas y terapéuticas han implicado a la insulino resistencia como primer mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de NAFLD, clave en la génesis de esteatosis hepática [30] y como un factor contribuyente del síndrome metabólico (Figura 3).

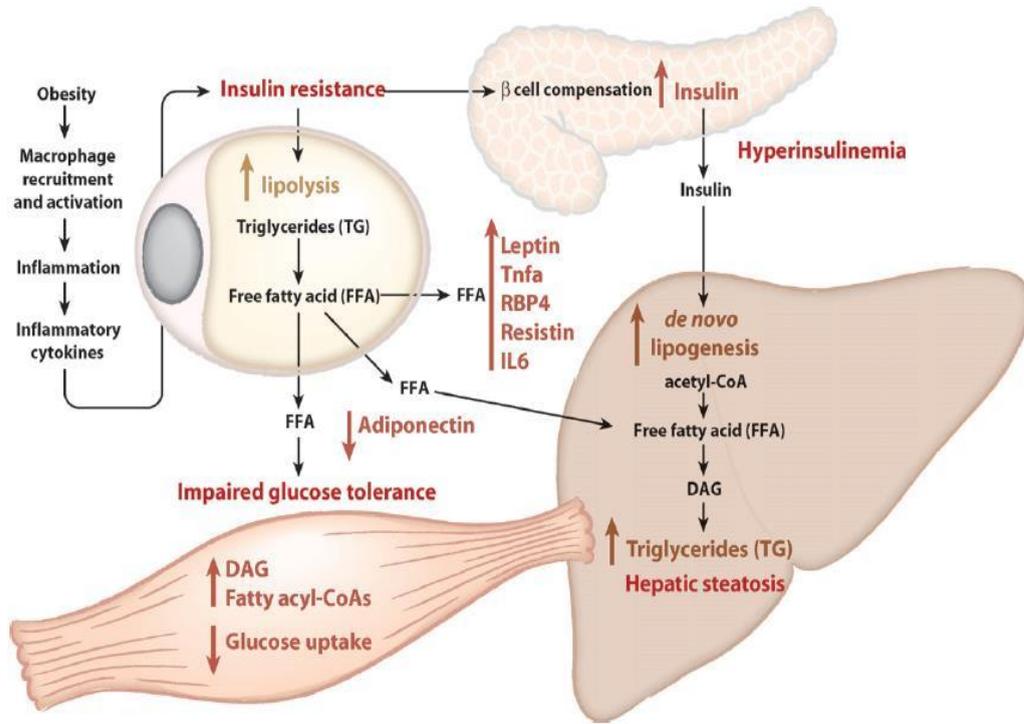


Figura 3. Mecanismos etiopatogénicos del síndrome metabólico.

FFA, ácidos grasos libres; DAG, diacilglicerol; TG, triglicéridos; Tnfa, factor de necrosis tumoral alpha; IL-6, interleucina 6; RBP4, proteína transportadora de retinol tipo 4; Co-A, coenzima A. Imagen tomada de Attie AD y Scherer PE. *Adipocyte metabolism and obesity. Journal of Lipid Research April Supplement. 2009; 20:395-9 [31].*

1.1.2.3 La enfermedad cardiovascular. Aterosclerosis

La obesidad es un factor de riesgo cardiovascular bien demostrado, importante para el desarrollo de enfermedades vasculares tales como la hipertensión y la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una patología compleja, multifactorial y dinámica, considerada actualmente como una inflamación crónica y evolutiva de la pared arterial, caracterizada por la activación de células endoteliales, depósito de lípidos y acumulación de células espumosas derivadas de MΦ [32, 33]. Sin dudas, es la principal causa de morbi-mortalidad en la sociedad occidental y entre sus múltiples factores de riesgo se distinguen la obesidad, el síndrome metabólico y la DM2 [34].

Asimismo, la hipercolesterolemia, la hipertensión, el tabaquismo, factores genéticos y la edad, son factores de riesgo altamente implicados en el desarrollo de aterosclerosis [35]. Recientemente, se han reconocido al tejido adiposo perivascular (TAP) y epicárdico (TAE) - dos tipos de TA viscerales- como factores de riesgo de relevancia para el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares. El depósito intracardíaco de

lípidos y su lipotoxicidad ha sido señalado como un factor a considerar en el desarrollo de la miocardiopatía [36].

Además de los factores de riesgo ya establecidos, la inflamación y las infecciones por ciertos patógenos en el contexto de un factor de riesgo no convencional, han sido implicadas como potenciales factores de riesgo de la enfermedad aterosclerótica [37]. El nuevo paradigma sugiere que la infección con bacterias y/o virus podría contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis ya sea, de manera directa, a través de la infección de las células del tejido vascular o bien indirectamente, a través de los efectos sistémicos mediados por las citocinas, proteínas de fase aguda u otros factores solubles inducidos por la infección, en sitios no-vasculares [38].

El sistema inmune innato juega un rol fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis; la abundante presencia de señales de daño endógenas (DAMPs), como LDL oxidadas (LDL_{ox}) y citocinas, son desencadenantes iniciales de la respuesta inflamatoria que caracteriza esta patología. En este contexto, cabe destacar, la importancia atribuida a la activación de los receptores de la inmunidad innata, principalmente TLR2 y TLR4, en la patogénesis inflamatoria de la aterosclerosis [33, 39]. Adicionalmente, se ha demostrado la participación clave de la autofagia junto al estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de esta patología [40, 41].

La patogénesis de la aterosclerosis aún no está completamente dilucidada, pero evidencias emergentes sugieren la participación de múltiples eventos celulares, entre ellos, la disfunción de las células endoteliales, inflamación, proliferación de células musculares lisas, alteración de la matriz extracelular y neovascularización. En términos generales, se postula que este proceso patológico comienza cuando las células endoteliales sufren cambios en su permeabilidad y/o rupturas, generando una injuria en la capa íntima arterial y la ocasional pérdida de células de la superficie endotelial [33]. Las células del músculo liso quedan expuestas a los lípidos séricos, como las LDL y a las plaquetas, permitiendo el depósito de lípidos en el espacio subendotelial donde van a ser oxidados.

Las LDL_{ox} y los factores de crecimiento derivados de las plaquetas estimulan la proliferación celular del músculo liso y contribuyen a la formación de estrías grasas que sobresalen hacia la luz del vaso, proceso clave en la aterogénesis [33, 42]. Las células espumosas son las responsables de fagocitar los esterios de colesterol que penetran la pared arterial lesionada, por medio de la interacción con receptores *scavengers*, como CD36. La estría grasa, cuyo principal constituyente son los MΦ, puede progresar al estadio de placa fibrosa, llamado ateroma [42].

SEGUNDA PARTE. TEJIDO ADIPOSO

1.2 El tejido adiposo. Clasificación.

Existen dos tipos de TA que se pueden distinguir, con funciones antagónicas entre sí: el TA blanco, cuya principal función es el almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos y el TA marrón, que se especializa fundamentalmente en disipar energía en forma de calor. A su vez, estos tejidos difieren entre sí en cuanto a su morfología, distribución, progenie y expresión génica. El exceso de TA blanco representa un factor de riesgo clave en el desarrollo de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, a diferencia de lo que supone el incremento del TA marrón [43] y por esta razón constituye el foco de estudio de esta tesis.

La distribución del TA blanco puede ser clasificada en dos depósitos principales: subcutáneo y visceral. El TA subcutáneo se localiza principalmente en la hipodermis, mientras que el TA visceral (TAV) puede ser dividido en tres depósitos mayoritarios:

i) omental, que se localiza circundante a los intestinos, ii) mesentérico, entre los intestinos y iii) retroperitoneal, cerca de los riñones, en la región dorsal de la cavidad abdominal. Existe un cuarto depósito de TAV, poco citado en la bibliografía hasta el momento, llamado pre-peritoneal, localizado a la altura del estómago pegado al peritoneo [44]. A su vez, pequeñas cantidades de TAV se encuentran distribuidas alrededor de órganos específicos como corazón (TAE) y vasos sanguíneos, como la aorta (TAP) [14, 36].

1.2.1 El tejido adiposo como órgano endócrino y productor de especies reactivas del oxígeno

Históricamente, el TA era considerado un órgano inerte, cuyas funciones claves eran el almacenamiento pasivo del exceso de energía en forma de lípidos, la protección de órganos y térmica.

Fue a partir de 1994, junto al descubrimiento de la leptina, que ha sido reconocida la capacidad del adipocito *per se* para secretar una gran variedad de hormonas y proteínas bioactivas –denominadas colectivamente adipocinas– con funciones pleiotrópicas que convergen en la regulación de la homeostasis corporal general [45]. Desde entonces y hasta la actualidad, el TA es considerado un órgano dinámico y endocrinamente activo [46]. Adicionalmente, es reconocido como un órgano con funciones inmunológicas importantes (Tabla II): produce y secreta citocinas pro-inflamatorias, expresa receptores de la inmunidad innata, es capaz de responder al estímulo con LPS y está constituido por otras células inmunes, entre ellas, MΦ [18, 47].

Tabla II. Participación del tejido adiposo en la respuesta inmune²

Secreción de citocinas	IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-33, IL-1RA
Secreción de quimiocinas	MCP-1, MIF, MIP-1 α , MIP1- β
Factores del complemento	factor B, factor D (adipsina), C1q, C1r, C1s, C3a
Secreción de adipocinas	adiponectina, leptina, resistina, visfatina
Miembros de la familia C1q/TNF	CTRP-3 (cartonectina), CTRP-1, CTRP-7
Factores de crecimiento	VEGF, M-CSF, GM-CSF
Expresión de receptores	TLR1-TLR9, receptor de IL-6 y TNF

² *Adaptado de Schaeffler y Schoelmerich. Innate Immunity and adipose tissue biology, 2010 [2].*

IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral; IL-1RA, antagonista del receptor A de IL-1; MCP-1, proteína quimioattractante de monocitos 1; MIF-1, factor inhibidor de macrófagos 1; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos; C, complemento; CTRP, proteínas relacionadas a C1q/TNF; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; M-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos; GM-CSF, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos; TLR, receptor tipo toll.

De manera interesante, el rol dual del TA en el metabolismo y la respuesta inmune, refleja la interrelación existente entre la nutrición y la inmunidad en situaciones fisiológicas y patológicas (Tabla III). Diversas alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia o altos niveles de FFA, son reportadas a diario en la clínica de diferentes situaciones infecciosas y en la sepsis. Del mismo modo, niveles aumentados de citocinas u otros mediadores pro-inflamatorios son observados durante la obesidad y sus complicaciones, demostrando así la existencia de moléculas con acción dicotómica producidas por el TA que regulan la función metabólica e inmunológica [2, 47].

Tabla III. Ejemplos de moléculas en tejido adiposo con función dicotómica en el metabolismo e inmunidad³.

Moléculas del tejido adiposo	Función Inmune	Función Metabólica
TNF α	pro-inflamatoria	insulino desensibilizante y lipolítica
IL-6	inmunomoduladora	insulino desensibilizante y lipolítica
Leptina	inmunomoduladora	regula la saciedad y la función pancreática
Adiponectina	anti-inflamatoria	insulino sensibilizante, anti-diabética
Resistina	pro-inflamatoria	pro-diabética
Visfatina	pro-inflamatoria	interfiere con el receptor de insulina
Cartonectina (CTRP-3)	anti-inflamatoria	regula secreción de adipocinas

³Adaptado de Schaeffler y Schoelmerich. *Innate Immunity and adipose tissue biology*, 2010 [2].

La inflamación crónica ha sido atribuida a la desregulación en la producción de adipocinas producidas por la expansión del TA en la obesidad. En términos generales, se postula que la expansión del tejido graso resulta en la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, con la consecuente hipoxia y estrés celular, que activa múltiples mecanismos de señalización que convergen en la secreción de citocinas pro-inflamatorias a nivel local y sistémico.

El estrés oxidativo es definido como una condición en la cual existe un desbalance entra la producción de ROS y las defensas antioxidantes, fenómeno que puede resultar en las complicaciones asociadas a la obesidad.

La inflamación del TA y el aumento del estrés oxidativo son mecanismos propuestos para explicar la patogénesis de la obesidad, aterosclerosis, IR y DM2 [16].

El TA constituye una fuente principal de producción de ROS; sin embargo, las bases mecanísticas que relacionan el daño tisular asociado al estrés oxidativo y la disfunción del TA no son totalmente conocidas [48].

La secreción de quimiocinas induce el reclutamiento de un mayor número de M Φ al tejido, que contribuyen a una creciente secreción de mediadores inflamatorios y favorecen el

desarrollo de un micro-ambiente inflamatorio exacerbado y deletéreo para el organismo. Sin embargo, sólo recientemente, se han identificado en detalle las fuentes celulares de producción de estas citocinas pro-inflamatorias, con evidencias actuales mostrando la participación de células del sistema inmune innato y adaptativo (Figura 4), incluidos MΦ con perfil inflamatorio F4/80+CD11c+CD206- [49], células dendríticas F4/80-CD11c+ [50, 51], mastocitos [52] y neutrófilos [53].

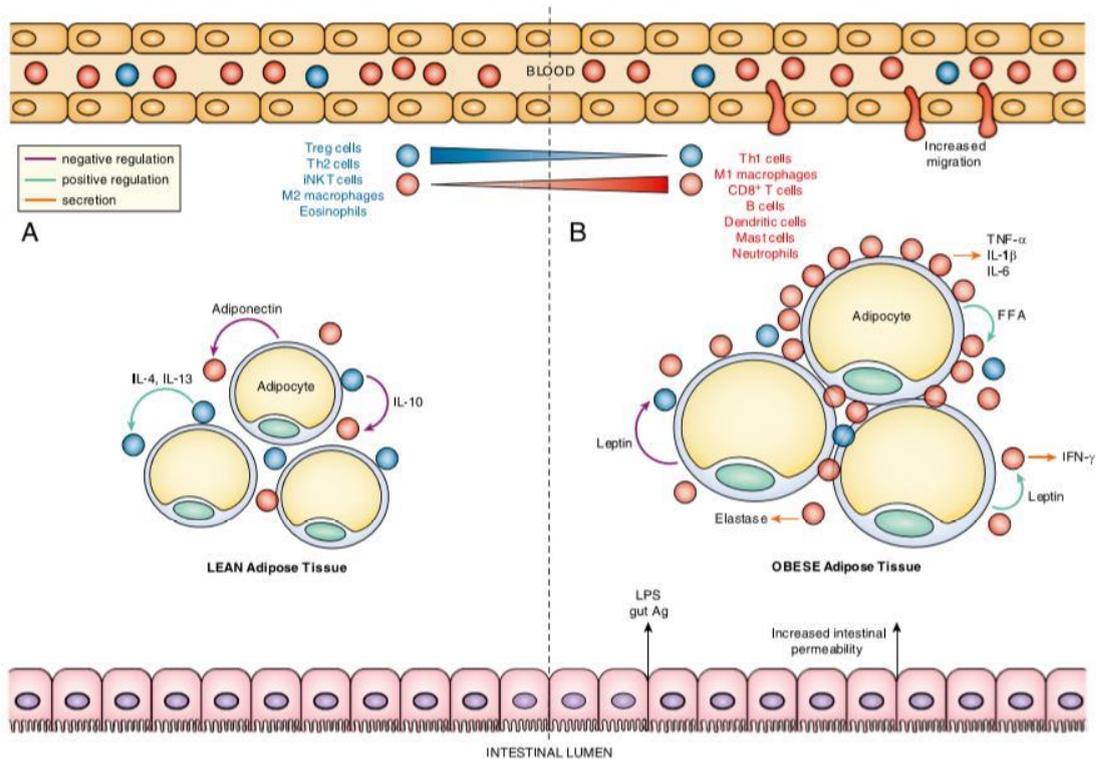


Figura 4. Células y mediadores inflamatorios implicados en la obesidad. A- tejido adiposo delgado y B- tejido adiposo obeso. LPS, lipopolisacárido; FFA, ácidos grasos libres; T reg *cells*, células T regulatorias; Th *cells*, células T helper; iNKT *cells*, células asesinas naturales innatas; CD, cluster de diferenciación; IL, interleucina; TNF- α , factor de necrosis tumoral alpha; INF, interferón; Ag, antígenos. Imagen tomada de Han JM y Levings MK. *Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation*, 2013 [47].

1.2.1.1 Adipocinas

Como hemos mencionado anteriormente, la función endócrina del TA se fundamenta en su capacidad para producir y secretar diversos factores que se denominan colectivamente adipocinas [14]. La adiposina (también conocida como complemento D) fue descrita por primera vez en 1987 [54]. En 1993, se identificó la producción de TNF- α por el TA, en modelos de diabetes y obesidad [18]. Posteriormente, la leptina fue reconocida como adipocina secretada por el TA y el inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1), inhibidor de la fibrinólisis, se encontró aumentado en el TAV de obesos sugiriendo un vínculo entre la obesidad y los desórdenes trombóticos [45, 55].

En 1996, se identificó a la adiponectina (también conocida como ACRP30 y ADIPOQ) como adipocina producida exclusivamente por el adipocito [56-58]. La secreción de estas adipocinas está regulada por diversos factores como ser la ingesta o la obesidad [18] y desempeñan funciones importantes en la regulación del metabolismo, de la inmunidad y a nivel cardiovascular, entre otras [8].

En situaciones de desregulación metabólica (obesidad), se produce un desbalance en la producción normal de estas adipocinas por parte del TA acumulado en exceso – con incremento de las adipocinas pro-inflamatorias y disminución de las anti-inflamatorias– contribuyendo al desarrollo y progresión de las complicaciones asociadas a la obesidad, tales como la IR [8, 14].

Leptina. En 1994, el producto del gen obeso *ob* (también conocido como *Lep*) se denominó leptina. La leptina circulante tiene un peso molecular de 16 KDa (con 164 aminoácidos) y es sintetizada principalmente por el TA, aunque no ha sido la única fuente descrita [45]. El gen *db* codifica para el receptor de leptina, que se expresa de manera general en diversos órganos, entre ellos el hipotálamo, donde ejerce su acción de manera endócrina y en TA, donde ejerce su acción paracrina o autocrina.

Dentro de sus principales funciones se destaca su rol en la regulación de la ingesta a nivel central, donde ejerce una acción anorexígena o de saciedad.

Friedman y col. (1998) han observado que animales *ob/ob*, carentes de leptina, muestran hiperfagia y desarrollan obesidad e IR y la administración de leptina es capaz de revertir dichos efectos [59]. Se ha demostrado que los niveles circulantes de esta adipocina se correlacionan con el aumento de masa adiposa, indicando un estado de resistencia a la leptina [59, 60]; individuos obesos muestran elevados niveles de leptina, sin la respuesta anorexígena esperada. Las bases moleculares de esta resistencia no son bien conocidas; sin embargo, las hipótesis más aceptadas sugieren que puede deberse a defectos en el receptor de la leptina o a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica [61].

La leptina puede activar directamente a la microglia hipotalámica, resultando en la secreción de citocinas pro-inflamatorias a nivel central y la consecuente activación de mecanismos de señalización intracelular que llevan a la IR y en última instancia, a la DM2 [62]. De hecho, se demostró que la inhibición de los mecanismos de las JNK y de NFkB a nivel central, mejora la IR en animales obesos [63].

Asimismo, se ha descrito la participación de la leptina a nivel inmunológico y en la regulación de la homeostasis de la glucosa [64, 65]. Con respecto a su función inmune, se comporta como una adipocina pro-inflamatoria ya que actúa promoviendo la proliferación celular y migración de monocitos y estimula la producción de TNF- α y de IL-6, principalmente. Además, induce la producción de citocinas del tipo Th1, como ser INF- γ e IL-2 y suprime la producción de citocinas del tipo Th2 (IL-4) [65].

En relación a la homeostasis de glucosa, se ha demostrado que la administración central de leptina normaliza los niveles de glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina tanto en animales no obesos con DM1, inducida por estreptozotocina (STZ), como en animales obesos *ob/ob* y *db/db* [64]. En la Figura 5 se muestran las acciones centrales de la leptina en el organismo.

La STZ es una glicosamina nitrosurea que administrada por vía intraperitoneal (i.p) actúa selectivamente sobre las células beta del páncreas mediante interacción con el transportador de glucosa GLUT2 generando daño en el DNA y necrosis de estas células [66].

De manera interesante, Chang y col. (2015) reportaron que la señalización mediada por leptina vía STAT3-G9a promueve la progresión del cáncer de mama durante la obesidad [67].

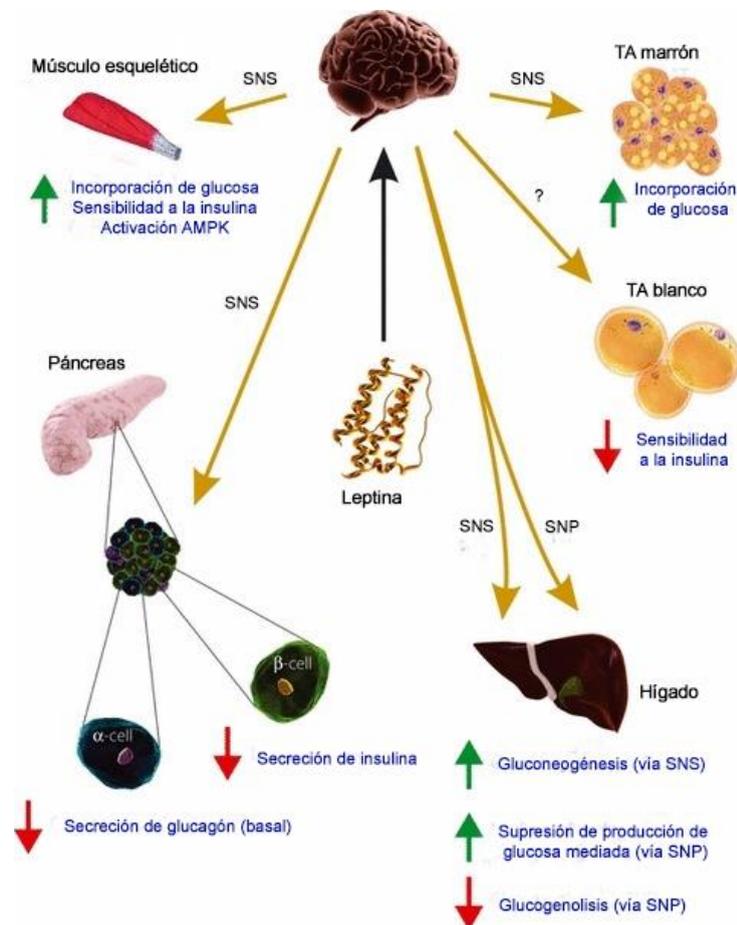


Figura 5. La acción central de la leptina participa en la homeostasis de la glucosa en diferentes tejidos periféricos.

AMPK, proteína quinasa activada por AMP; TA, tejido adiposo; SNP, sistema nervioso parasimpático; SNS, sistema nervioso simpático. Imagen adaptada de *Denroche HC. The role of leptin in glucose homeostasis. 2012 [64].*

Interleucina 6 (IL-6). La IL-6 es una citocina multifuncional con actividad inmunomoduladora producida por distintos tipos celulares, incluyendo las células del TA. Se

estima que aproximadamente un tercio de la cantidad total de IL-6 circulante proviene del TA, por lo que se postula que el aumento de adiposidad y de IL-6, representaría un factor de riesgo para el desarrollo de las complicaciones observadas en enfermedades metabólicas y vasculares, entre ellas, la obesidad, síndrome metabólico, DM2 y aterosclerosis [14]. En la clínica, los niveles circulantes de esta citocina se correlacionan con el incremento de adiposidad y de IR; los niveles sistémicos de IL-6 están incrementados en pacientes obesos y con DM2. De hecho, los valores elevados de IL-6 en plasma predicen el desarrollo de DM2 [14].

La IL-6 y otras citocinas, constituyen factores de riesgo para el desarrollo aterosclerótico debido a su efecto sobre la formación y desestabilización de la placa de ateroma mediante su contribución en: la producción de otras citocinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda (PFA), la oxidación de LDL por la acción de fosfolipasas, la liberación de mediadores pro- trombóticos y la activación de metaloproteasas [68].

Factor de necrosis tumoral alpha (TNF α). El TNF α es una citocina pleiotrópica pro- inflamatoria producida fundamentalmente por monocitos, M Φ , linfocitos T y células endoteliales. El TA se ha identificado como una fuente principal de producción de esta citocina y si bien se expresa en adipocitos y células de la fracción estromal vascular (SVF), la mayor producción de TNF α proviene de los M Φ y no de los adipocitos maduros [68].

Esta citocina desempeña un rol clave en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En modelos animales de obesidad y DM2, la expresión de TNF α se encuentra aumentada en TA y varios estudios han demostrado que su neutralización mejora la sensibilidad a la insulina en TA y músculo [18, 69-71].

Es bien conocido que esta citocina atenúa la fosforilación de los residuos de tirosina, estimulada por la insulina, a nivel del receptor de insulina y del IRS-1, en TA y músculo, disminuyendo la acción de esta hormona (Figura 1) [71].

En individuos obesos, los niveles plasmáticos de esta citocina se encuentran incrementados y numerosos ensayos clínicos en humanos han demostrado la existencia de una correlación positiva entre sus niveles en sangre y diversos marcadores de IR [70, 72]. Tras el intento de hallar resultados prometedores vinculados a la mejora en la insulino sensibilidad, se han conducido diversos estudios a nivel clínico y experimental, antagonizando la acción de TNF α . Sin embargo, los hallazgos obtenidos en humanos, no han logrado aportar resultados convincentes [73, 74].

A su vez, los niveles plasmáticos de TNF α predicen daño vascular. En este aspecto, esta citocina ha sido asociada con la presencia de aterosclerosis temprana en individuos sanos de mediana edad [75] y sus niveles elevados en la fase estable luego del infarto de miocardio fueron asociados con un riesgo incrementado de eventos coronarios recurrentes [76, 77].

Proteína quimioattractante de monocitos (MCP1/ CCL2). MCP1 es miembro de la familia de quimiocinas C-C y un importante factor quimioestático de monocitos. Esta quimiocina es producida por una variedad de tipos celulares, de manera constitutiva o inducida, incluyendo células endoteliales, epiteliales, células musculares lisas, fibroblastos, astrocitos, células de la microglia y monocitos. Sin embargo, los monocitos/M Φ son las principales fuentes de producción de MCP1 [78], que regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria y células asesinas naturales (NK) en los tejidos, función mediada por el receptor de quimiocina CCR2. Ajuebor y col. (1998) demostraron el reclutamiento de monocitos hacia focos inflamatorios mediado por MCP1 [79].

Diversos estudios en modelos animales de obesidad inducidos por HFD o en animales obesos genéticamente modificados (*ob/ob*), han demostrado la expresión elevada de MCP1 en TA; observación que ha sido extendida en humanos [14]. En la obesidad, los niveles sistémicos incrementados de esta quimiocina, son suficientes para generar el reclutamiento de M Φ hacia el TA y el consecuente estado pro-inflamatorio.

Además, se ha evidenciado que el aumento en el número de M Φ infiltrantes en TA induce un estado de intolerancia a la glucosa y de IR. En concordancia, la delección somática del gen *Ccl2* protege a los animales del reclutamiento de M Φ y de la inflamación resultante en TA, así como de las perturbaciones metabólicas luego de la administración de una HFD [14].

Diversos estudios han relacionado a la MCP1 con las enfermedades cardiovasculares. Experimentos conducidos en animales deficientes en MCP1 o CCR2 han comprobado que la ausencia, de esta quimiocina o su receptor, conlleva a una disminución del depósito lipídico arterial. En relación, tanto MCP1 como su receptor, juegan un papel relevante en el desarrollo de la aterosclerosis [80].

Adiponectina. Esta adipocina formada por 244 aminoácidos (30 KDa) es producida casi exclusivamente por los adipocitos. Sus niveles circulantes son elevados (3 a 30 $\mu\text{g/ml}$) y es posible detectar tres isoformas diferentes, como trímeros, hexámeros y estructuras oligoméricas de alto peso molecular [14]. La adiponectina actúa a través de sus receptores adipoR1 y adipoR2, que se expresan de manera ubicua en el organismo.

A diferencia de la mayoría de las adipocinas producidas por el TA, los niveles de adiponectina en TA y plasma se encuentran disminuidos en pacientes obesos, con DM2 y con enfermedad cardiovascular [81]. Existen evidencias que apoyan la asociación existente entre los niveles de adiponectina y las desregulaciones asociadas a la obesidad: i) sus niveles se correlacionan negativamente con el aumento de TAV, ii) en pacientes con DM2, se encuentran disminuidos respecto a pacientes delgados, iii) altos niveles circulantes están relacionados con un bajo riesgo de desarrollo de DM2 [14].

Diversos estudios en animales han demostrado el efecto protector de la adiponectina sobre la IR [82, 83]. Su administración en animales diabéticos favorece la

acción de la insulina, resultando en la disminución de la hiperglucemia; mientras que en animales obesos, contribuye al incremento en la oxidación de ácidos grasos en músculo y a la reducción de los niveles plasmáticos de triglicéridos, FFA y glucosa [14].

Numerosas investigaciones se han conducido con el propósito de estudiar la asociación entre los niveles de adiponectina y los marcadores inflamatorios. En relación, una correlación negativa entre los niveles de la proteína C reactiva (CRP) y adiponectina, ha sido observada en pacientes obesos y diabéticos [84]. La función anti-inflamatoria de la adiponectina, vinculada a la disminución de la secreción de citocinas pro-inflamatorias, también se fundamenta en otros estudios que han avalado su capacidad para modular la función inflamatoria de M Φ y promover su polarización hacia un perfil anti-inflamatorio M2 [85].

Existe evidencia clínica que apoya la función cardioprotectora de la adiponectina. En este sentido, se ha demostrado la asociación entre niveles de adiponectina y el riesgo aumentado de desarrollar enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio, hipertensión e hipertrofia ventricular izquierda [14]. En concordancia con estos hallazgos, en un modelo experimental de aterosclerosis se demostró que la sobreexpresión de adiponectina disminuye la formación de lesiones ateroscleróticas y disminuye la expresión de receptores *scavenger* clase A, de TNF α y VCAM-1 en la aorta de estos animales [14, 86, 87].

Llamativamente, los niveles de adiponectina se han encontrado incrementados en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, como el lupus o artritis reumatoidea. Esto se podría explicar, en parte, como un mecanismo compensatorio; no obstante, la significancia clínica de estos hallazgos requiere de futuras investigaciones abocadas al contexto de patologías inflamatorias [88].

1.2.2 Composición celular del tejido adiposo

La composición del TA no es estática, sino que varía dinámicamente respondiendo a los estímulos del micro-ambiente local y sistémico. En circunstancias como la obesidad, se inducen cambios en la composición celular e inclusive, en el fenotipo celular individual.

En términos generales, los leucocitos que integran el TA durante la obesidad son de un fenotipo pro-inflamatorio: macrófagos con perfil M1, neutrófilos, linfocitos CD4+ y CD8+ y mastocitos. En contraposición, en el TA de individuos delgados, la población mayoritaria representa un fenotipo anti-inflamatorio, con prevalencia de macrófagos M2, eosinófilos y células T reguladoras [89].

1.2.2.1 Adipocitos

Las células adiposas han sido estudiadas intensamente en los últimos años como resultado del preocupante aumento de la prevalencia e incidencia de la obesidad a nivel mundial y del reconocimiento del TA como integrador de una variedad de mecanismos fisiológicos.

Los adipocitos son células especializadas en el almacenamiento de lípidos, principalmente en forma de triglicéridos, en organelas denominadas corpúsculos lipídicos. Actualmente, es ampliamente reconocida la importante actividad endócrina de los adipocitos y como tal, su contribución activa al balance energético total del organismo [56-58].

En mamíferos, los adipocitos maduros del TA blanco son generalmente uniloculares (presentan una única gota de lípidos) y el tamaño de la célula adiposa puede variar entre 30-130 μ m de diámetro, dependiendo de la cantidad de lípido almacenado en el corpúsculo lipídico. Es importante señalar que el volumen del adipocito está relacionado a su funcionalidad celular; adipocitos con un volumen mayor exhiben una mayor actividad metabólica y endócrina [90].

Scherer y col. (2000) demostraron por primera vez, la expresión inducida del receptor TLR2, en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 luego del estímulo con LPS y en consecuencia, surgió la apreciación del adipocito como parte del sistema inmune innato [91]. Posteriormente, se demostró que los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico son ligandos naturales del TLR4 y estimulan su activación y secreción de citocinas y quimiocinas por parte de las células adiposas [92, 93]. Además de la expresión de estos receptores, los adipocitos son capaces de responder y de secretar citocinas como TNF α , IL-1 β e IL-6.

Interesantemente, los adipocitos han sido identificados como células blanco para la infección de una amplia variedad de microorganismos, como es el caso del parásito *Trypanosoma cruzi*, del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), citomegalovirus, adenovirus e Influenza A; generando disturbios tanto a nivel inmune como metabólico [1, 2] (Figura 6).

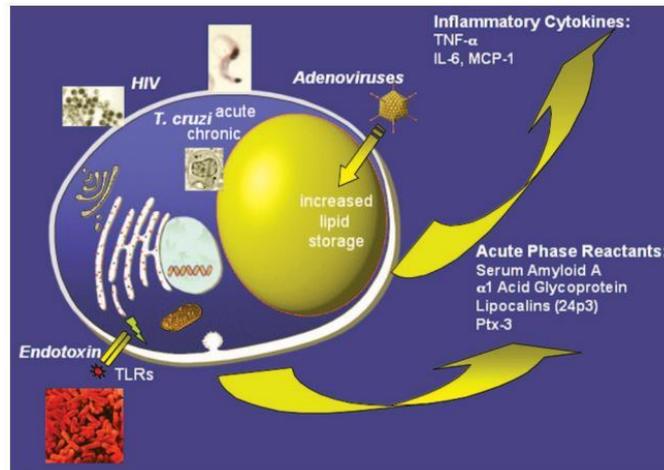


Figura 6. Representación esquemática de los principales agentes infecciosos en la célula adiposa y las adipocinas mayormente involucradas en respuesta a la infección local y sistémica. HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; TLRs, receptores tipo toll; TNF- α , factor de necrosis tumoral alpha; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioattractante de monocitos; Ptx-3, pentraxina 3. Imagen tomada de *Desruisseaux. Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. Minireview, 2007 [1]*.

Corpúsculos lipídicos. Los corpúsculos lipídicos han estado asociados con la acumulación pasiva de lípidos en el interior de las células. Hace unas décadas, sin embargo, fruto de análisis proteómicos realizados en estas organelas, se ha demostrado su dinamismo y funcionalidad activa [94]. Su estructura se caracteriza por presentar un núcleo o “core” hidrofóbico (lipídico) central rodeado por una monocapa de fosfolípidos y proteínas (conocidas genéricamente como perilipinas, PLIN), tales como perilipina (PLIN1) y adipofilina (PLIN2/ ADRP).

Respecto a su función, es conocido que los corpúsculos lipídicos ejercen una función protectora celular merced a la incorporación de ácidos grasos, que de otra forma, serían sujetos a mecanismos no-oxidativos con la consecuente lipotoxicidad y eventual lipoapoptosis celular [95]. La movilización de lípidos es mediada por el proceso de lipólisis, que puede deberse a la acción de las lipasas asociadas a estas organelas y/o al proceso de autofagia y específicamente lipofagia, reconocido recientemente en diversos tipos celulares. Dos estudios independientes conducidos en animales han demostrado la función peculiar de la autofagia en el TA, aparentemente asociada a la regulación de la fisiología del adipocito y diferente al rol clásico de la autofagia en la movilización de lípidos, en otros tipos celulares. La inhibición selectiva de genes vinculados a la autofagia afecta negativamente la diferenciación del TA blanco y la delección total de los mismos, reduce el contenido de corpúsculos lipídicos en ratones [17].

Los corpúsculos lipídicos están presentes en varios tipos celulares (0.1 a 10 μm) y en los adipocitos representan un tipo único y particular (hasta 130 μm). En tanto PLIN1 es la

principal proteína que compone a los cuerpos lipídicos en células adiposas maduras en estado basal, PLIN2 o ADRP es la proteína estructural predominante en condiciones lipolíticas, lo que sugiere un papel activo de esta durante el fenómeno de lipólisis [96].

1.2.2.2 Macrófagos en el tejido adiposo

Los macrófagos desempeñan un rol clave en la inflamación del TA asociada a desordenes metabólicos. Existe evidencia clínica y experimental que avala el incremento en el número de M Φ infiltrantes en el TA (ATM) obeso.

Se postula, que uno de los mecanismos responsables del infiltrado de M Φ es el elevado número de células adiposas muertas resultante de la hipertrofia, hiperplasia e hipoxia del TA obeso. Una lesión fundamental del TA disfuncional obeso, es la presencia de estructuras tipo corona (CLS), formadas por M Φ circundantes alrededor de una célula adiposa muerta, con el fin de fagocitar los restos lipídicos y celulares [97]. Asimismo, el mecanismo de mayor relevancia vinculado al aumento del número de macrófagos infiltrantes, es la expresión de CCR2 en TA [98]. Por ejemplo, animales que carecen de MCP1 o de su receptor CCR2, tienen un reducido número de ATM; mientras que, la sobreexpresión específica de MCP1, aumenta la cantidad de ATM infiltrantes [14, 99, 100].

Originalmente, los macrófagos se han clasificado en dos tipos principales: M Φ con perfil M1 o de activación clásica, compatibles con un fenotipo pro-inflamatorio y M Φ con perfil M2 o de activación alternativa, que expresan un fenotipo anti-inflamatorio. La polarización hacia un perfil M1 depende de la presencia de citocinas del tipo Th1 (como INF γ) y de productos bacterianos (LPS); mientras que, la activación hacia un perfil M2, involucra la presencia de citocinas del tipo Th2 (IL-4 e IL-13). En términos generales, los macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF α) y los del tipo M2, citocinas anti-inflamatorias que participan en la remodelación tisular y resolución de la inflamación.

El Receptor Gamma Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas (PPAR γ), es un factor de transcripción con función anti-inflamatoria, ampliamente ligado a la polarización de macrófagos M2 y es un factor clave para la diferenciación de adipocitos [47, 49, 81].

Diversos estudios han sido conducidos en modelos animales y humanos, con el propósito firme de caracterizar de una manera más precisa, cual es el fenotipo predominante de los ATM durante la obesidad. Existe evidencia que demuestra la prevalencia de M Φ M2 en TA de animales e individuos delgados y la polarización hacia un perfil M1 durante el transcurso de la obesidad [49, 89, 98, 101].

Lumeng y col. (2007) reportaron que los MΦ acumulados en el TA obeso, eran de un perfil pro-inflamatorio CD11c+ (M1) y que estos conformaban las CLS [49, 102]. Asimismo, en otro estudio se demostró la correlación positiva entre la cantidad de macrófagos M1 a nivel tisular y el desarrollo de IR, en ratones alimentados con HFD [103]. Sin embargo, en su trabajo, Shaul y col. (2010) demostraron que animales sujetos a una HFD, mostraban un predominio de macrófagos M1 luego de las 8 semanas de tratamiento, mientras que a las 12 semanas, estos macrófagos CD11c+ exhibían una expresión incrementada de genes asociados al perfil M2 [104]. Por el contrario, Ji y col. (2012) reportaron a los 4 días de tratamiento con HFD, una polarización alternativa de macrófagos en TA [105].

En la actualidad se conoce que los MΦ pueden modificar su fenotipo de acuerdo al microambiente que los rodea; sin embargo, el tipo de polarización que ocurre realmente en el TA obeso, es un tema aún por dilucidar.

El escenario actual establece que mientras los macrófagos M1 mantienen su perfil pro-inflamatorio, estos también pueden adoptar características de remodelación del tipo M2. Asimismo, los macrófagos de perfil anti-inflamatorio M2, son capaces de secretar mediadores pro-inflamatorios en ciertas situaciones específicas [98].

1.2.3 Expresión de receptores de la inmunidad innata en el tejido adiposo

1.2.3.1 Receptores tipo *toll*

Los receptores tipo *toll* (TLR) constituyen una parte fundamental de la inmunidad innata y forman parte de la primera línea de defensa del organismo. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), con motivos altamente conservados entre microorganismos, como así también, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que son moléculas endógenas como los FFA y las LDLox, producidas en ciertas situaciones patológicas [2, 33].

Ambos estímulos, exógenos y endógenos, desencadenan cascadas de señalización intracelular que culminan en la activación de los factores de transcripción NF-κβ, AP-1 y factores reguladores de interferón (IRFs) y la consecuente producción de citocinas pro- inflamatorias, quimiocinas e interferones. La señalización de los TLR consiste, al menos, en dos mecanismos: uno dependiente de MyD88 que lleva a la producción de citocinas pro-inflamatorias y que es común a todos los TLR (excepto para TLR3) y otro independiente de MyD88 asociado a la estimulación de interferón-β (INF-β) y la maduración de células dendríticas [33].

Recientemente, diversas revisiones y artículos en las áreas de inmunología [106], endocrinología [107] y metabolismo [108] han detallado el rol de los TLR en la

autoinmunidad, la disfunción del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, la función endócrina pancreática, la función tiroidea, metabolismo, nutrición, IR y DM [2].

Existen sólidas evidencias que sugieren al TLR4 como un eslabón clave en el vínculo de la respuesta inmune con la IR. Primero, la expresión de TLR4 está incrementada en MΦ del TA en la obesidad [109, 110]; segundo, animales *knockout* para TLR4 (TLR4 *-/-*) o con pérdida de función del gen *tlr4* por mutación génica están protegidos de la IR asociada a la obesidad [109, 111]; tercero, la delección específica de TLR4 en células hematopoiéticas mejora la resistencia a la insulina inducida por una HFD, en hígado y TA [112]; cuarto, los FFA liberados durante la lipólisis del adipocito *in vitro*, inducen la activación del factor de transcripción NF-κβ en MΦ mediante TLR4 [113]; quinto, el receptor 120 acoplado a proteína G (GRP120) es activado por ácidos grasos insaturados omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA) e inhibe la IR mediante la supresión de la activación de TLR4 en macrófagos [114].

Los niveles de FFA están incrementados en la obesidad; los ácidos grasos saturados, como ácido palmítico, esteárico y láurico, inducen respuesta inflamatoria por medio de TLR4. En TA, se piensa que esta situación inflamatoria está agravada por la interacción entre MΦ y adipocitos que resulta en una retroalimentación positiva: el reconocimiento de los FFA por el TLR4 presente en MΦ induce, por un lado, la secreción de TNFα, la cual estimula la lipólisis de adipocitos y la liberación de más FFA al medio; y por el otro, la secreción de MCP1, que recluta una cantidad cada vez mayor de macrófagos al tejido inflamado.

Por otro lado, estudios *in vivo* han implicado a TLR2 en la patogénesis de la obesidad y otros desordenes metabólicos [115]. La ausencia de este receptor (TLR2*-/-*) protege del incremento de adiposidad, de IR, hipercolesterolemia y esteatosis hepática, inducidas por la dieta [116, 117]. Por el contrario, Carcilli y col. (2011) han demostrado el desarrollo de IR en animales TLR2*-/-* debido a cambios en la microbiota intestinal [118]. Si bien, varios estudios han avalado su compromiso en la insulino resistencia, el rol de TLR2 en los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad es controvertido.

1.2.3.2 Receptores basureros o *scavenger*

En un principio los receptores *scavenger* fueron reconocidos en su capacidad de ligar partículas de LDL modificadas por oxidación o acetilación, con lo cual se postulaba su participación en el desarrollo de la aterogénesis. Actualmente, se conoce que integran un amplio espectro de receptores de la inmunidad innata con la particularidad de reconocer múltiples ligandos tanto endógenos (DAMPs) como exógenos (PAMPs).

Se describen clásicamente tres tipos: A, B y C. El grupo B de estos receptores transmembrana incluye a los receptores *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) y *cluster* de

diferenciación 36 (CD36, también conocido como *fatty acid traslocase*), este último de interés en el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral. Luego de su descubrimiento en plaquetas hace 40 años (1980s), CD36 es reconocido actualmente como una glicoproteína de membrana ampliamente expresada en diversos tipos celulares incluyendo cardiomiocitos, células del endotelio vascular, células musculares lisas, MΦ, adipocitos y hepatocitos [119]. Dentro de sus ligandos naturales podemos mencionar a un amplio espectro de moléculas endógenas como lipoproteínas nativas y oxidadas (LDLox), fosfolípidos aniónicos, componentes de células apoptóticas, amiloide beta (amiloide-β), colágeno y además, se ha demostrado el reconocimiento de eritrocitos infectados con *plasmodium falciparum* [119].

A nivel metabólico, CD36 facilita la transferencia de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la célula y responde a concentraciones elevadas de glucosa. También ha sido reportada la participación de CD36 en la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos [120].

Kennedy y col. (2011) investigaron el rol de CD36 como mediador de la interacción entre adipocitos y macrófagos en modelos murinos de obesidad *in vitro* e *in vivo* y demostraron que la interacción paracrina existente entre estas células en TA es mediada por CD36 y promueve la inflamación crónica e IR durante la obesidad [121]. Sin embargo, el papel de CD36 frente a la protección de la resistencia a la insulina es controversial, existiendo en la bibliografía reportes que avalan la protección mediada por CD36 frente a dicha condición inflamatoria [122, 123].

Recientemente, se ha sugerido un nuevo rol para este receptor, vinculado a la migración de fagocitos hacia el TA durante la obesidad inducida por dieta (DIO), así como también, en la adipogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* [124].

La expresión de CD36 está ampliamente relacionada a procesos ateroscleróticos, siendo un regulador negativo de la angiogénesis y promoviendo la apoptosis endotelial, el estrés oxidativo, la agregación plaquetaria y la formación de células espumosas [125]. Trabajos pioneros en el tema demostraron una marcada reducción del área de lesión aterosclerótica en animales Apoe -/- (modelo genético de aterosclerosis) y carentes del receptor CD36, avalando el paradigma de que la incorporación de LDLox mediada por este receptor, es esencial para la formación de células espumosas y la evolución de la aterosclerosis [126].

Adicionalmente, la expresión de CD36 ha sido vinculada a la enfermedad de Alzheimer a través del reconocimiento de amiloide-β acumulado y la consecuente activación de la respuesta inflamatoria y degeneración neuronal [127].

1.3 TERCERA PARTE. Enfermedad de Chagas.

1.3.1 El agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

El parásito protozooario intracelular obligado *T. cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, que se encuentra en la naturaleza en hospedadores vertebrados tales como seres humanos, animales silvestres y domésticos e invertebrados, como los insectos vectores. El parásito es transmitido al hospedador vertebrado a través de insectos hematófagos que pertenecen a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*.

En la actualidad, la OMS estima que aproximadamente 7 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y unas 25 millones de personas en riesgo de infección [128]. La enfermedad de Chagas es endémica en América del Sur y Central. En las últimas décadas, su diagnóstico se ha incrementado en países donde la enfermedad no es endémica como Estados Unidos, Europa y Japón [129].

1.3.1.1 Ciclo de vida

El *T. cruzi* posee variaciones morfológicas y funcionales, alternando entre los estadios que sufren división binaria y las formas no replicativas e infectantes. En las formas replicativas se incluyen los epimastigotes, presentes en el tubo digestivo del insecto vector y los amastigotes, observados en el interior de las células de los mamíferos. Las formas no replicativas e infectantes, tripomastigotes metacíclicos, son encontradas en las heces y orina del insecto vector y los tripomastigotes circulantes, en la sangre de los mamíferos.

En el hospedador invertebrado, el ciclo se inicia durante la alimentación del insecto. Los tripomastigotes que se encuentran en la sangre del hospedador vertebrado, son ingeridos por los insectos. Algunos días después, los parásitos se transforman en epimastigotes y esferomastigotes y una vez en intestino, se dividen repetidamente por división binaria. En gran cantidad, los epimastigotes se conectan a la cutícula rectal y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos pudiendo, ambas formas, ser eliminadas a través de las heces y orina [130].

El ciclo en el hospedador vertebrado se inicia cuando las formas infectantes, eliminadas por el insecto vector, entran en contacto con mucosas o regiones de la piel lesionadas. Los tripomastigotes metacíclicos son altamente infectantes, pudiendo invadir los primeros tipos celulares que encuentran como MΦ, fibroblastos o células epiteliales. En estas células, ocurre la proliferación intracelular y la liberación de tripomastigotes al espacio intercelular, invadiendo nuevas células localizadas en el lugar de la infección y/o diseminándose por la corriente circulatoria a los tejidos del hospedador, a excepción

de los eritrocitos. Después de varios ciclos de infección (de 7 a 30 días), el número de parásitos circulantes aumenta y el hospedador pasa a desarrollar una robusta respuesta inmune y así, la infección puede ser controlada. Entretanto, algunos parásitos parecen permanecer, contribuyendo con la patología de la enfermedad de Chagas. El ciclo de vida se completa cuando la sangre de un hospedador mamífero infectado es nuevamente succionada por el insecto vector [130, 131].

1.3.1.2 Progresión clínica de la enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir dos fases clínicas: aguda (generalmente asintomática o con sintomatología no específica) y crónica, etapa donde se desarrollan las formas más severas de la enfermedad [132]. La fase aguda comienza con el inicio de la infección y se extiende entre 2 a 4 meses; mostrando una elevada parasitemia, altos niveles de citocinas pro-inflamatorias (INF γ , TNF α) y una intensa activación de linfocitos T y B. La mayoría de las personas infectadas permanecen asintomáticas (forma indeterminada) durante años o incluso décadas; no obstante, alrededor del 30% de los pacientes desarrollan principalmente complicaciones cardíacas o gastrointestinales, características de la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Figura 7). Las bases de la cardiomiopatía chagásica crónica han sido tema de debate durante muchos años. La inmunopatología debido a la persistencia del parásito es considerada un elemento clave en el desarrollo de esta cardiomiopatía infecciosa, aunque también, hay numerosas evidencias considerando a la respuesta autoinmune [133, 134].

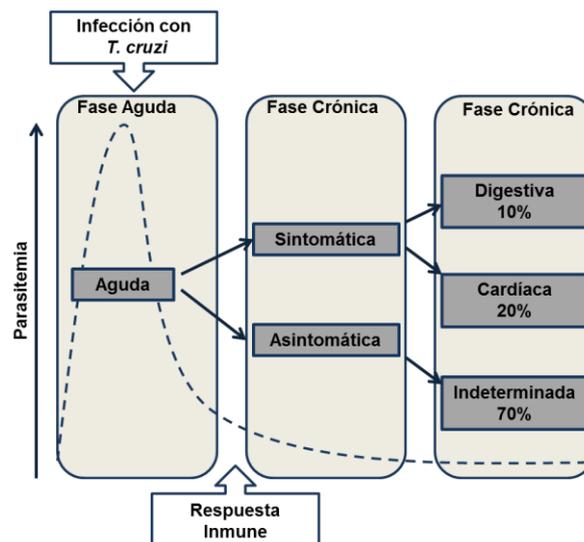


Figura 7. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas en humanos.

Imagen adaptada de Dutra WO. *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*, 2009 [132].

En los últimos años, se ha descrito un tropismo diferencial del parásito por el TA, tanto en la fase aguda como crónica de la infección. Sin embargo, continúa siendo un área de interés poco investigada.

1.3.2 El tejido adiposo en la infección con *Trypanosoma cruzi*

La patogénesis de la enfermedad de Chagas ha sido asociada a la desregulación metabólica, asociación que surgió con la observación de una mayor incidencia de diabetes en individuos infectados con *T. cruzi* [135]. Investigaciones posteriores demostraron tanto la disminución en los niveles de insulina, como así también, la respuesta alterada de glucosa en pacientes chagasicos [136].

En este contexto, en modelos murinos de diabetes inducida con drogas (STZ) y con predisposición genética a la diabetes (*db/db*), se demostró una mayor parasitemia y mortalidad luego de la infección con *T. cruzi*, sugiriendo que la desregulación metabólica es beneficiosa para la invasión del parásito en el huésped [137]. Asimismo, los animales en la etapa aguda de la infección presentaron hipoglucemia, aunque valores normales de insulina y niveles disminuidos de adiponectina y leptina en sangre. En la etapa crónica, una carga parasitaria alta fue detectada a los 300 días post- infección en TA por PCR cuantitativa, acompañada de una disminución de adiponectina local y sistémica. Estas últimas observaciones sugieren el compromiso de la célula adiposa en la progresión de la enfermedad y apuntan a considerar al TA como un reservorio del parásito.

Estudios *in vitro* en células adiposas 3T3-L1 demostraron el compromiso de esta célula en la infección con *T. cruzi*. Combs y col. (2005) mostraron por microscopía electrónica que los adipocitos podían ser infectados eficientemente por este parásito [138]. Posteriormente, Nagajyothi y col. (2008) reportaron el fenotipo pro-inflamatorio y el compromiso inmune de la célula adiposa durante la infección con *T. cruzi* [139].

Ferreira y col. (2011) demostraron la presencia del parásito en biopsias de TA de individuos con enfermedad de Chagas, confirmando que este tejido es un reservorio del *T. cruzi* en humanos [140].

1.3.3 La inmunidad innata en la infección con *Trypanosoma cruzi*

El parásito atraviesa la barrera de la piel y se disemina a sangre y tejidos induciendo una respuesta inmune temprana en el huésped, mediante la participación de las proteínas del complemento y de fase aguda. Estas moléculas se unen al *T. cruzi* y median la endocitosis mediada por receptores.

En la infección con *T. cruzi* se ha demostrado la participación de los receptores TLR2, TLR4 y TLR9. Particularmente para TLR2, este es capaz de activarse debido a la

presencia de los antígenos Rab-5, proteína necesaria para la internalización del parásito en macrófagos [141] y de la mucina GPI [142]. Los compuestos del tipo glicoinositolfosfolípidos presentes en el parásito son principalmente reconocidos por TLR4 [143]. Asimismo, el DNA del *T. cruzi* estimula la producción de citocinas a través de la señalización de TLR9 en el interior de las células presentadoras profesionales, como MΦ y células dendríticas [144].

Es importante resaltar el compromiso de los TLR en la infección con *T. cruzi*, demostrado en ratones deficientes en estos receptores, los cuales presentan una mayor parasitemia y mortalidad, asociadas a una alterada respuesta pro-inflamatoria [145, 146].

En adipocitos se reportó el aumento de los genes para TLR2 y TLR9, pero no para TLR4, luego de la infección *in vitro* con *T. cruzi* [139] y en TA de animales infectados, se demostró el compromiso de TLR4 y TLR9 [147].

La activación de estos receptores genera la secreción de citocinas y mediadores pro-inflamatorios, como IL-12, TNF α y óxido nítrico (ON) en macrófagos inflamatorios. La IL-12 induce la producción de IFN γ , que junto al panel de citocinas pro-inflamatorias producidas, contribuyen a la muerte intracelular del parásito [142, 143, 148].

Recientemente (2013) se demostró, que la cruzipaina purificada del *T. cruzi* al igual que la infección parasitaria, son capaces de inducir la expresión de TLR2 y la secreción de IL-6 en cardiomiocitos murinos, favoreciendo su supervivencia celular, mediante un mecanismo que involucra la fosforilación de PI3K [149]. Esto sugiere, de algún modo, que el parásito favorecería su supervivencia en las células donde se aloja, mediante una regulación de la respuesta inflamatoria e inmune generada por el huésped, en pos de su eliminación.

En este aspecto, está surgiendo un creciente interés sobre los PPARs en infecciones parasitarias, debido a la modulación que ejercen sobre la respuesta inflamatoria y el metabolismo del huésped. La activación de PPARs aparecería como una estrategia del parásito para favorecer su supervivencia mediante el incremento del metabolismo energético y la supresión de la inflamación, lo que permitiría su invasión y evitaría oportunamente su destrucción. El hecho de controlar la respuesta inflamatoria del huésped, la activación de PPARs favorecería el establecimiento de infecciones crónicas y la oportuna relación simbiótica entre el parásito y el propio huésped [150].

ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

El reconocimiento de la obesidad como principal fuente de enfermedades humanas incluyendo DM2 y patologías cardiovasculares, ha engendrado un fuerte interés en la disfunción metabólica e inflamatoria y ha identificado a la insulino resistencia como un mecanismo fisiopatológico central [151]. Su prevalencia e incidencia están incrementando en la población general y la OMS estimó que habría unos 600 millones de adultos obesos en el 2014 (4). La aterosclerosis es un proceso complejo, multifactorial y dinámico; hoy considerada, una inflamación crónica de la pared arterial, caracterizada por activación de células endoteliales, reclutamiento de monocitos a la pared vascular y diferenciación de macrófagos reclutados a células espumosas ricas en colesterol [33, 152]. Entre sus múltiples factores de riesgo, la obesidad, IR y DM2 y los mecanismos fisiopatológicos que la caracterizan – en especial el componente inflamatorio- favorecen su desarrollo [34]. El TA se reconoce actualmente como un órgano endocrinamente activo y dinámico, con participación en la homeostasis metabólica e inmunológica del organismo [46]. Su disfunción es clave en el proceso patológico de la obesidad y sus co-morbilidades, siendo la inflamación, el resultado mediato de dicha disfuncionalidad. Numerosas evidencias experimentales sostienen que la obesidad causa una inflamación crónica de grado bajo [11, 12], contribuyendo a una disfunción metabólica local y sistémica. Estos hallazgos permiten hacer una vinculación con la hipótesis inflamatoria de la aterosclerosis [33, 37], IR y DM2 [18, 19], que si bien han sido demostradas ampliamente, los componentes bioquímicos que participan en la cascada pro-inflamatoria permanecen aún controvertidos. En este contexto, evidencias epidemiológicas y estudios experimentales han permitido establecer una relación de causalidad entre infecciones bacterianas y virales y la progresión de la obesidad y aterosclerosis [2, 33, 37]. Sin embargo, el papel del parásito protozoo intracelular *T.cruzi* ha sido poco estudiado. Diversos estudios, incluido los de nuestro laboratorio, han demostrado que el *T. cruzi* puede invadir y replicarse en una amplia gama de tejidos del huésped, mostrando un tropismo diferencial por corazón, músculo esquelético y el TA que rodea a los órganos, principalmente retroperitoneal [153]. Sin embargo, el conocimiento sobre la invasión *in vivo* del TA visceral, hipertrofiado en la obesidad y sus consecuencias sobre el metabolismo de lípidos y glucosa desregulados en esta infección, es escaso, siendo su efecto sobre la respuesta inmune innata, un tópico cuya investigación ha sido recomendada recientemente por Schäffler y Schölmerich [2]. La respuesta inmune innata es mediada principalmente por PRRs, como TLR y *scavenger* clase B, que reconocen y se activan ante estructuras muy conservadas asociadas a patógenos (PAMPs) o asociadas a daño endógeno (DAMPs). Diversos estímulos

inflamatorios entre ellos, los FFA circulantes y las LDL, incrementados durante la obesidad, IR y aterosclerosis, pueden inducir la síntesis de citocinas y adipocinas por el TA/adipocitos y macrófagos, mediante el reconocimiento y activación de los receptores mencionados anteriormente. Estos mediadores solubles promueven la síntesis hepática de proteínas de fase aguda y contribuyen a la inflamación local y sistémica [154, 155], así como a la disfunción metabólica general del organismo. Dentro de los receptores *scavenger*, el CD36, co-receptor de TLR2, se expresa en MΦ y otros tipos celulares y liga LDL modificadas u oxidadas y ácidos grasos de cadena larga, entre otras moléculas [119, 156]. El receptor TLR4 reconoce principalmente a LPS, presente en bacterias Gram negativas y a los FFA saturados, dentro de sus ligandos endógenos [14, 92, 93]. La participación de TLR2 ha sido demostrada en el reconocimiento de Rab-5 y mucina GPI presentes en *T. cruzi* [142]. Asimismo, cabe destacar la importancia de la activación de los receptores CD36, TLR2 y TLR4, en la patogénesis inflamatoria de la aterosclerosis [33, 39]. Recientes estudios demostraron una vía funcional TLR en adipocitos y en TA [2, 91-93].

Nuestro laboratorio, desarrolló un interesante modelo experimental de aterosclerosis en ratones C57BL/6, alimentados con dieta moderada en grasa y se demostró la inducción de un síndrome metabólico, sobrepeso y dislipemia aterogénica que sería responsable de las lesiones incipientes observadas en hígado y aorta de animales tratados. Hubo además aumento de grasa visceral cardíaca y muy interesantemente, en adventicia de la aorta torácico-abdominal, donde se observó una intensa infiltración de células inmunes, compatibles con MΦ [157]. Estudios experimentales en modelos de obesidad inducidos por HFD y genéticos (ratones *ob/ob* o *db/db*), han demostrado la acumulación de MΦ en TA, que expresan fundamentalmente genes asociados al fenotipo inflamatorio M1 [49, 89, 98, 101], aunque existen resultados contradictorios [104, 105].

La importancia funcional de los diferentes depósitos grasos es poco conocida; sin embargo, evidencia reciente sugiere que los cambios en la secreción de adipocinas, debidos a la dieta, podrían ejercer influencia en la funcionalidad del tejido asociado [36]. Estos antecedentes nos han impulsado a focalizar nuestra atención en los estudios destinados a comprender el papel del TA/adipocitos y los eventos bioquímicos, celulares y moleculares que ocurren en modelos experimentales de obesidad. En este sentido, diversos estudios se han llevado a cabo en modelos animales artificiales, inducidos por dietas hipercalóricas y HFD, o con modificaciones genéticas, lo que dificulta la extrapolación a los casos de obesidad y co-morbilidades que dominan el campo clínico [151, 158].

Los antecedentes descriptos y resultados previos de nuestro laboratorio, demostrando que la infección experimental aguda con *T. cruzi* en ratones C57BL/6 modularía la expresión de TLR [159], nos motivaron a desarrollar en el presente trabajo de tesis, un modelo experimental de obesidad *in vivo* inducido por dieta moderada en grasa/fructosa y administración de estreptozotocina (STZ).

Cabe señalar que la cepa de ratones utilizados presenta una susceptibilidad natural a la aterosclerosis, por una mutación puntual en el gen de fosfolipasa A2.

Asimismo, se propone complementar los resultados observados *in vivo* con estudios *in vitro* en una línea celular 3T3-L1 de adipocitos de ratón, células claves del TA.

En conjunto, estos antecedentes permiten especular que el *T. cruzi* sería un factor pro-aterogénico potencial, ya que posee componentes estructurales (PAMPs) capaces de interactuar con receptores de la inmunidad innata, como TLR2, presentes en TA y generar así una respuesta inflamatoria local y sistémica que favorecería la patogenia de la enfermedad aterosclerótica. La interacción ligando/receptor inicia una cascada de señalización intracelular que favorecería la secreción de citocinas y adipocinas pro-inflamatorias y favorecería el curso de las patologías inflamatorias como la obesidad y co-morbilidades asociadas. Además, la presencia de un contexto nutricional capaz de inducir obesidad (dieta moderada en grasa/fructosa/STZ), con incremento de FFA circulantes, podría activar el receptor TLR4 y/o CD36 y favorecer el estado inflamatorio de estas patologías. Adicionalmente, se podría hipotetizar que la combinación de ambos estímulos inflamatorios, infección (PAMPs) y nutrición (DAMPs), potenciarían la inflamación y estrés oxidativo inducidos por la infección *per se*. Sin embargo, no se debería descartar la posibilidad de que la respuesta inmune inflamatoria pueda ser modulada en forma diferencial en la etapa aguda y crónica en estas condiciones experimentales, ya que el parásito podría manipular la maquinaria metabólica e inmune del huésped para favorecer su sobrevivencia en los tejidos que coloniza, entre ellos, el TA.

Para comprobar estas hipótesis nos planteamos realizar estudios en dos escenarios diferentes, un modelo de obesidad *in vivo* y una línea celular de adipocitos murinos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Estudiar la influencia de la infección con *Trypanosoma cruzi* y la nutrición en un modelo experimental de obesidad inducido por dieta sobre la respuesta metabólica de glúcidos y lípidos, la inmunidad innata y el potencial sinergismo sobre las alteraciones cardiovasculares y hepáticas.

2.2.2 Objetivos específicos

En el modelo experimental *in vivo* en ratones machos C57BL/6 salvajes alimentados con dieta moderada en grasa/fructosa y tratados con estreptozotocina, se inducirá obesidad e insulino resistencia con el propósito de:

- Evaluar la expresión de receptores tipo *Toll* (TLR2) y *scavenger* clase B (CD36) en tejido adiposo visceral, e identificar el fenotipo de macrófagos infiltrantes.

- Determinar citocinas inflamatorias, quimiocinas, adipocinas y otros mediadores inflamatorios en plasma.

En el modelo *in vitro* en una línea celular de adipocitos 3T3-L1 diferenciados, se propone:

- Investigar la influencia de la infección con *T. cruzi*, ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y mono-insaturado (oleico) en la expresión basal y post estímulo del receptor *scavenger* CD36.

- Cuantificar las citocinas inflamatorias en el sobrenadante de los cultivos celulares frente a los estímulos propuestos.

- Estudiar la modulación de los corpúsculos lipídicos en la célula adiposa luego del tratamiento con *T. cruzi* y ácidos grasos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo de obesidad e infección *in vivo*

3.1.1 Diseño experimental y tratamiento

Los ratones C57BL/6 (haplotipo MHC H-2Kb) se adquirieron en la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina y los ratones C57BL/10ScNJ deficientes para TLR4 (Tlr4^{lps-del}) se obtuvieron de Laboratorios Jackson, Bar Harbor, USA. Los animales se mantuvieron en ciclos estándares de luz (12 hs luz/oscuridad) y con acceso ilimitado a comida y agua, en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba (UCC), siguiendo las recomendaciones de la Guía de Uso y Cuidados de Animales de Experimentación (Consejo Canadiense de Cuidados de animales) y aprobado por el Comité de Ética de la UCC.

Para el diseño experimental se usaron animales de 6 a 8 semanas con un peso corporal inicial de 22-25 gramos (g), los que se dividieron al azar en 4 grupos experimentales:

- 1- Grupo dieta control, **DC**: los animales se alimentaron con dieta estandar rata/ratón con contenido bajo en grasas (3% de grasas) y se inocularon con 100 µl de *buffer* fosfato salino (PBS), pH 7.4 por vía intraperitoneal (vía i.p.).
- 2- Grupo dieta obesogénica, **DO**: los animales se alimentaron con dieta moderada en grasa (14% de grasas), fructosa (D-levulosa Anedra) al 5% en el agua de bebida y una dosis mínima no diabetogénica de estreptozotocina (STZ, Sigma) de 8 mg/Kg de PC, por vía i.p. La fructosa se administró con el objeto de acelerar el desarrollo de resistencia periférica asociada a la obesidad y la STZ para favorecer la progresión a DM2.
- 3- Grupo dieta obesogénica + infección, **DO+I**: estos animales recibieron el mismo tratamiento del grupo DO pero se los infectó con 500 tripomastigotes de la cepa Tulahuen por vía i.p., a los 10 días de iniciado el tratamiento con la dieta.
- 4- Grupo dieta control + infección, **DC+I**: animales alimentados con la dieta estandar rata/ratón e inyectados con 100 µl de PBS pH 7.4 por vía i.p. A los 10 días, estos animales se infectaron con 500 tripomastigotes de la cepa Tulahuen por vía i.p.

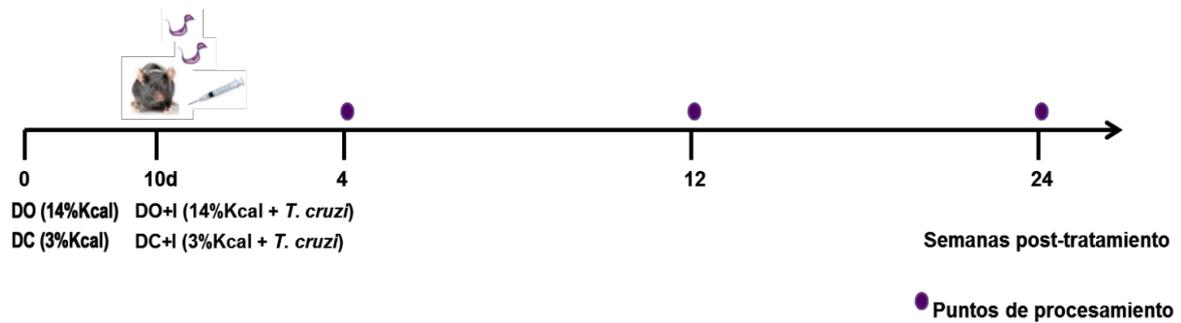


Figura 8. Representación esquemática del diseño experimental *in vivo* con ratones salvajes C57BL/6.

La composición porcentual de la dieta estandar rata/ratón (GEPSA) y de la dieta moderada en grasas (PURINA, Dog Chow raza pequeña) se detalla en la Tabla IV.

Tabla IV. Composición porcentual de los nutrientes de las dietas utilizadas en los grupos experimentales: (A) Estandar rata/ratón, (B) Moderada en grasas.

Composición	(A) Dieta estandar	(B) Dieta moderada en grasas
Proteínas (%)	26	25
Carbohidratos (%)	53	50
Grasas (%)	3	14
Fibras (%)	8	3
Minerales totales (%)	10	8

A las 4, 12 y 24 semanas de estudio, se extrajo sangre por punción cardíaca en presencia de heparina 5000 U.I (Abott) como anticoagulante, para la posterior separación de plasma. A estos tiempos, los animales se sacrificaron para la obtención de los siguientes tejidos: hígado, TAV, corazón y aorta.

En los grupos DO+I y DC+I, la infección fue corroborada en sus dos etapas:

- Etapa aguda: mediante el recuento de tripomastigotes en sangre, usando una cámara de Neubauer, diluida con *buffer* de lisis (solución de cloruro de amonio, NH_4Cl 0.87% en PBS) para la eliminación de los glóbulos rojos [160]. A través del recuento de parásitos/ml de sangre, se realizaron las correspondientes curvas de parasitemia entre los días 7 y 35 días post-infección. Los animales que superaron la etapa aguda de la infección pasaron a cronicidad, posibilitando su estudio a las 12 y 24 semanas.

- Etapa crónica: se detectaron los anticuerpos (IgG) en sangre por ELISA Chagas (Wiener Laboratory, Chagatest) a las 24 semanas. Títulos de anticuerpos IgG anti- *T. cruzi* mayores a 1/1024 fueron detectados en este tiempo.

Los parásitos se mantuvieron por pasajes seriados de ratón a ratón utilizando 5000 tripomastigotes. La parasitemia se midió en sangre a los 14 días, momento en el cual los animales alcanzaban el pico de parasitemia, mediante extracción por punción cardíaca y previa dilución con *buffer* de lisis. La cuantificación de los parásitos se realizó como se indicó anteriormente. Cada animal fue inoculado por vía i.p. con un volumen de 100 μ l (con jeringa de tuberculina y aguja 25G) de sangre equivalente a 5000 parásitos (diluida en PBS). Este procedimiento se repitió cada 14 días para asegurar el mantenimiento de la cepa de parásitos.

3.1.2 Parámetros morfométricos

Los animales se estudiaron a las 4, 12 y 24 semanas post tratamiento. Para el análisis de parámetros morfométricos se registraron: peso corporal, índice de masa corporal (IMC) y diámetro de cintura. El PC se obtuvo mediante el uso de una balanza analítica (Ohaus, Modelo CS200) y fue expresado en gramos (g). El diámetro de cintura y la altura de los animales, se obtuvieron con el uso de una cinta métrica en centímetros (cm). El diámetro de cintura se midió tomando como referencia una distancia de 1,5 cm desde la inserción de los miembros inferiores; mientras que la talla se determinó desde la inserción del nacimiento del rabo hasta el extremo superior del cráneo. El IMC se calculó en base a la relación de PC (Kg) con respecto al cuadrado de la altura (m^2).

Adicionalmente, como una manera de analizar la obesidad central, se evaluó la variación de TAV, en cada uno de los animales en estudio. A las 4, 12 y 24 semanas, los animales se sacrificaron para la recolección del TAV y el registro de peso (g) de dicho tejido. La variación de TAV en cada animal se expresó como porcentaje (%) respecto al peso corporal (g) total (peso TAV/ peso corporal _{inicial} x 100).

Se realizó un registro del consumo de alimentos por parte de los diferentes grupos, pesando la cantidad consumida por animal día por medio a las 4, 12 y 24 semanas de estudio. Se colocó un animal por caja para cada condición analizada con una cantidad inicial de alimento igual en cada caja.

3.1.3 Muestras bioquímicas

Para la obtención de muestras bioquímicas se realizó la extracción de sangre por punción cardíaca, con un ayuno de 12 hs, usando heparina sódica (5000 U.I) como anticoagulante [161]. El plasma se separó mediante una centrifugación a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 7 minutos (min), utilizando una centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D). Las muestras se conservaron en freezer -80°C. Se emplearon jeringas de tuberculina y agujas 25 G (Terumo) para la recolección.

3.1.3.1 Determinaciones bioquímicas: medición de glucosa e insulina

La glucosa se cuantificó por el método enzimático de la glucosa oxidasa (Roche) y colorimetría según Trinder utilizando el equipo Hitachi modular P800 y se expresó en mg/dL [162]. La insulina fue determinada (U.I.) por radioinmunoensayo (RIA) utilizando el *kit* de insulina DPC *Coat A Count* (Siemens) y el equipo *Ingetron* MODELO MN2200-E.

Evaluación de la resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se calculó mediante el índice HOMA-IR (*Homeostatic model assessment*) utilizando la siguiente fórmula: glucemia en ayunas (mg/dL) × insulina en ayunas (mU/mL) / 405. Los niveles de insulina en plasma se midieron con un *kit* de RIA insulina Escudo DPC A Count (Siemens) utilizando un contador de pozo Ingetron MODELO MN2200-E. Los niveles de glucosa en plasma se midieron usando un *kit* enzimático (Roche) en un autoanalizador *Hitachi modular* P800.

3.1.3.2 Determinaciones bioquímicas: medición de los lípidos plasmáticos

Las concentraciones de triglicéridos (TG) y colesterol total (CT) plasmáticos se obtuvieron mediante el uso de *kits* enzimáticos (Roche) y el empleo de un autoanalizador *Hitachi P800 modular*. Las unidades de medida empleadas fueron mg/dL.

3.1.3.3 Determinaciones bioquímicas: alanin aminotrasferasa (ALT)

La medición de ALT se realizó por un método enzimático-colorimétrico (*kit* de Roche) en un autoanalizador *Hitachi modular P800*.

3.1.4 Apolipoproteína apoB100

La medición de la apoB100 se realizó en plasma a las 12 y 24 semanas de estudio por una técnica de inmunoturbidimetría, utilizando el aparato *Modular P 800*. Las unidades de medida empleadas fueron mg/dL.

3.1.5 Perfil de lipoproteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

El perfil lipoproteico se evaluó en plasma a las 12 y 24 semanas de estudio, utilizando como base el método descrito por Singh y col. (2008) [163]. Las muestras se dejaron en contacto con una solución de Sudan black B (1% m/v), previamente filtrada, durante toda la noche a 4°C. La relación mantenida fue 1:1 (plasma: Sudan Black B) y el gel de poliacrilamida realizado fue de un 3-4% para los geles concentrador y separador, respectivamente. Se sembraron 20 µL de muestra por calle y se cubrió con *buffer* de corrida nativo pH 8.8. La corrida se realizó en la cuba electroforética a 30V por 90 min y luego a 50V hasta la separación completa de las bandas de lipoproteínas.

Geles de electroforesis y *buffer*

Preparación del gel separador al 4%:

Agua desionizada: 3.10 mL
 1.5 M Tris- HCl pH 8.8: 1.25 mL
 Acrilamida/Bis 30 %: 0.66 mL
 Persulfato de NH₄ 10% (0,1 g/ml): 25 µL
 TEMED: 2.5 µL

Preparación del gel espaciador al 3%:

Agua desionizada: 3.05 mL
 1.5 M Tris- HCl pH 6.8: 1.25 mL
 Acrilamida/Bis 30 %: 0.65 mL
 Persulfato de NH₄ 10% (0,1 g/mL): 100 µL
 TEMED: 5 µL

Buffer de corrida nativo pH 8.8 1x:

Tris: 3.0 g
 Glicina: 14.4 g
 Agua: 1000 mL

3.2 Cultivo celular de adipocitos 3T3-L1 y tratamiento

3.2.1 Protocolo de diferenciación celular y diseño experimental

Los estudios *in vitro* se realizaron con la línea celular de fibroblastos 3T3-L1 derivada de embrión de ratón. Por ser una línea celular de fibroblastos comprometida hacia la línea adipogénica, puede mantenerse como tal, o pueden ser estimuladas a diferenciarse a adipocitos, en ciertas condiciones de incubación. Las células se mantuvieron en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) de alta glucosa (4.5 g/L) sin glutamato, suplementado con 10% de suero bovino (Sigma) y 1% (v/v) de penicilina- estreptomycin (PS) en atmosfera húmeda con 10% CO₂, 90% aire a 37°C. Las células se diferenciaron en adipocitos adaptando el método descrito por Engelman y col. (2000) [164]. Los preadipocitos se sembraron en placas de 24 pozos (2x10⁴ células/pozo) y se llevaron a 100% de confluencia (48h, aproximadamente). Una vez confluentes, se colocó un medio de inducción de diferenciación (MID) conteniendo 0.3 UI/mL de insulina, 1 µM de dexametasona y 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) en presencia de 10% SFB (Sigma) en DMEM y se consideró como el día cero (d0) de diferenciación. A las 72 h (d3), el MID se reemplazó por medio de mantenimiento (MM1) suplementado con 0.3 UI/mL de insulina y 10% SFB y la mitad del volumen de dicho medio fue cambiado por medio fresco cada 48h hasta el día 9 de diferenciación (d9). Los adipocitos se consideran totalmente diferenciados al d9 y los experimentos se realizaron entre los días 9 y 14 de diferenciación. Este protocolo, como así también los experimentos *in vitro*, fueron llevados a cabo en el Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ-Brazil.

3.2.2 Protocolo de tratamiento con ácidos grasos e infección con *T. cruzi*

Los adipocitos maduros fueron tratados con FFA de cadena larga, insolubles en el medio celular (DMEM) y lipotóxicos para las células, si no están conjugados con albumina sérica bovina (BSA, Sigma). Para poder conjugar los FFA con BSA se utilizó el método descrito por Liu y col. (2014), con algunas modificaciones [165]. En primer lugar, los FFA se disolvieron en etanol 100% (calidad biología molecular) para alcanzar una concentración inicial de 500 mM y se calentaron en baño de agua a 60°C para ayudar a la completa disolución de los mismos. Luego se mezcló cada uno de los FFA utilizados con una solución de BSA (10%, 1.5 mM) en una relación molar 4:1 (FFA: BSA) en DMEM con 0.25% SFB y se dejaron en estufa a 37°C durante 2hs. La concentración final de cada FFA utilizada para los experimentos fue de 50 µM. Pasado este tiempo, la mezcla se sonicó en baño de agua por 15 min, se dejó estacionar a 55°C por 15 min y se pasó por un filtro de 0.22 µm. Antes del estímulo, los adipocitos se privaron de SFB por 3hs y luego se

incubaron por 24hs con ácido palmítico (Ac.P) y ácido esteárico (Ac.E) –que aumentan en plasma de los animales en tratamiento con la dieta moderada en grasas (Dog Chow)- y con ácido oleico (Ac.O) mono-insaturado. Cantidades iguales de etanol (vehículo, veh.) fueron adicionadas a las células controles, con el fin de mantener iguales concentraciones de este solvente entre las muestras.

Previo al tratamiento con FFA, algunas de las células fueron estimuladas con tripomastigotes (cepa Tulahuen) manteniendo una relación de infección 1:1 (parásito: célula). Para ello, antes del tratamiento con los FFA, las células se dejaron en contacto con los parásitos por un período de 3hs. Luego, se realizaron varios lavados (3 o más) con DMEM para eliminar parásitos en sobrenadante y se procesaron las muestras a las 24 y/o 48 hs de iniciado el contacto con los parásitos. El número de células viables se determinó por la exclusión del colorante azul de Tripán, usando para el recuento una cámara de Neubauer.

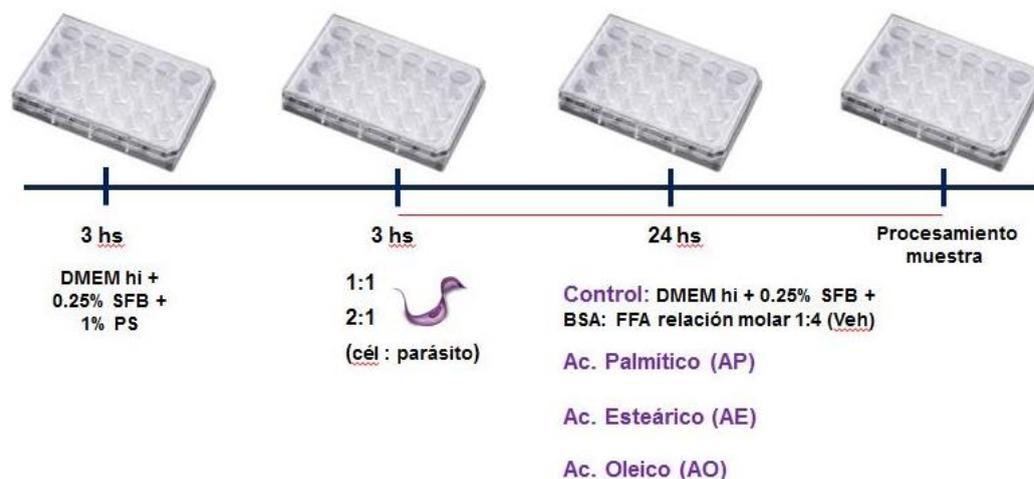


Figura 9. Esquema representativo del diseño experimental para células adiposas 3T3-L1. DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; SFB, suero fetal bovino; PS, penicilina- estreptomycin; FFA, ácidos grasos libres; AP, ácido palmítico, AE, ácido esteárico; AO, ácido oleico.

3.3 Proteínas del perfil inflamatorio y anti-inflamatorio

3.3.1 Citocinas y adipocinas

El plasma de los ratones se recolectó a las 4, 12 y 24 semanas de tratamiento y el sobrenadante de cultivo a las 24 y 48hs. Se realizó un ensayo de ELISA para las citocinas IL-6, TNF α y la quimiocina MCP1. El análisis de MCP1 se realizó mediante el empleo de un *kit* de ELISA MCP1 (Biolegend, cat 43270510). Brevemente, las placas de ELISA se sensibilizaron con el anticuerpo de captura contra la citocina de interés (e-Bioscience y Biolegend) durante toda la noche a 4^o C. Luego, se lavaron las placas con solución de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20) y se bloquearon con una solución de PBS con 10%

de SFB pH 7.0 por 2 hs a temperatura ambiente. Se procedió a lavar los pocillos y sembrar las muestras de plasma de los diferentes grupos y las distintas diluciones del testigo, usando las citocinas recombinantes para cada caso (eBioscience y Biologend), durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario anti-citocina biotilnado (e-Bioscience y Biologend) por 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar, se agregó el reactivo enzimático estreptavidina-peroxidasa (dilución 1/250 en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Finalmente, las placas se lavaron y la reacción fue revelada usando el sustrato tetrametil bencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA en placas *Microplatereader* (Bio-Rad).

El análisis de adiponectina y leptina, se llevó a cabo mediante el uso de *kits* comerciales para ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Abcam e Invitrogen, respectivamente). El *kit* para adiponectina (ab108785) tiene una sensibilidad de 0.7 ng/mL y la sensibilidad correspondiente a la leptina (KMC2281) es <50 pg/mL.

La curva testigo para cada ensayo (concentración vs. absorbancia) se realizó utilizando el software Prism (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA), a partir de la cual fue posible calcular la concentración de cada muestra en cuestión, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado en cada caso e interpolando las absorbancias de las muestras en la respectiva curva testigo.

Los anticuerpos de captura utilizados fueron: IL-6: 1000 µg/mL, dilución 1/1000 en *high binding solution* (carbonato de sodio 0.1 M) pH 9.5; TNF-α: 500 µg/mL, dilución 1/125 en *high binding solution* pH 6.0 y MCP1: dilución 1/200 en *high binding solution* pH 9.5. Los anticuerpos recombinants fueron: IL-6: 2000 µg/µL (1/125); TNF-α: 2000 pg/L (1/250); MCP1: 4000 pg/mL. Los anticuerpos de detección: IL-6: 500 µg/mL (1/167); TNF-α: 500 µg/mL (1/250); MCP1 (1/200).

3.3.2 Proteínas de fase aguda

Para evaluar los cambios de las proteínas plasmáticas a las 4 semanas, se realizó una electroforesis automatizada en agarosa de los animales tratados, utilizando el equipo Interlab G-26. El perfil de las proteínas obtenido fue: albumina y fracciones *alpha*-1 (α-1), *alpha*-2 (α-2), *beta* (β) y *gamma* (γ); α-1 y α-2 representan proteínas de fase aguda en roedores [154].

3.3.3 Western Blot

Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a las 24 semanas para la obtención de TAV. Se recolectó una porción de tejido de unos 30 mg aproximadamente y se lisaron en RIPA *buffer* con la adición de un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Sigma), con un homogeneizador manual y a 4°C. Realizado el homogenato de tejido correspondiente, las muestras se dejaron en reposo durante 30 min en hielo. Luego de centrifugar (Eppendorf Centrifuge 5415D) las muestras a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C, los sobrenadantes se recolectaron, fraccionaron y guardaron a -80°C hasta su utilización.

Antes de cada experimento, se sembraron cantidades equivalentes de proteínas, dosadas por el método de Bradford [166]. Se diluyó una cantidad correspondiente a 50 µg de proteínas en *buffer* de muestra y se desnaturalizaron en baño seco a 105°C por 5min. Posteriormente, un volumen igual a 20 µL por muestra desnaturalizada se sembró y se sometió a una corrida electroforética en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 7.5%.

La corrida electroforética se realizó utilizando un *buffer* de corrida y un voltaje (100 voltios) durante 90 min y luego, 150 voltios durante 45 min o hasta visualizar la separación completa de los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

Luego de la separación completa de las proteínas, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) utilizando *buffer* de transferencia, a 100 voltios durante 90 min en hielo.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS (TRIS-HCl pH7.4) por 60 min a T^oamb y posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios policlonales específicos diluidos en solución de bloqueo: anti-TLR2 (1/400, Abcam) y anti-CD36 (1/100, SantaCruz), obtenidos en conejo y dirigidos contra ratón. La incubación con los anticuerpos primarios fue durante toda la noche a 4°C, con agitación constante. Al otro día, las membranas se lavaron durante 60 min con TBS-Tween 0.05% (TTBS) y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (peroxidasa de rabanita): anti-conejo para CD36 y TLR 2 (1/3000, Sigma) durante 60 min a T^oamb, con agitación. Luego de realizar el lavado con TTBS 0.05%, la aparición de bandas antígeno-anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia (Tabla V) y se expusieron a un film de alta sensibilidad (Kodak) en cuarto oscuro. El tiempo de exposición promedio fue de 2 min para CD36 y 10 min para TLR2.

Tabla V. Composición del revelador quimioluminiscente (ECL) para Western Blot.

Reactivos	5 mL
Ac Cumárico	27 μ L
Luminol	125 μ L
Tris 100 mM pH 8.5	0,5 mL
H ₂ O ₂ 3,6%	15 μ L
H ₂ O Mq	4335 μ L

Como control de carga se utilizó la β -actina. El anticuerpo primario anti- β actina obtenido en cabra (1/400, SantaCruz) se dejó en contacto con la membrana por 180 min a T°amb y el anticuerpo secundario anti-cabra con dilución 1/1000 (Santa Cruz) conjugado con HRP, se dejó en contacto por 60 min.

Cabe destacar las diferencias metodológicas entre los estudios *in vivo* e *in vitro*. Para el estudio por western blot de células cultivadas *in vitro*, se procedió al lisado con ayuda de un rodillo manual en *buffer* de muestra 1x, seguido de la desnaturalización de la mezcla a 105°C por 5 min en baño seco. Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis fueron: anti- CD36 obtenido en conejo (dilución 1/1000, SantaCruz), anti- PPAR γ H-100 en conejo (dilución 1/1000, SantaCruz) y anti- ADRP en cerdo guinea (dilución 1/500, Fitzgerald), dirigidos contra ratón. Los anticuerpos secundarios (anti- conejo y anti- cerdo guinea) fueron utilizados en dilución 1/10000. En este caso, el anticuerpo primario anti- β -actina utilizado fue obtenido en caballo (dilución 1/20000, SantaCruz) y el secundario anti-caballo se usó en dilución 1/10000. El resto de los detalles experimentales son iguales a los realizados para los estudios *in vivo*. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante el uso del *software ImageJ*.

Geles de electroforesis

Gel separador al 7.5%

Agua desionizada: 2.24 mL

1.5 M Tris- HCl pH8.8: 1.25 mL SDS10% p/v: 50 μ L Acrilamida/Bis 30 %: 1.25 mL

Persulfato de NH₄ 10% (0.1 g/mL): 25 μ L

TEMED: 2.5 μ L

Gel espaciador al 4%

Agua desionizada: 3.05 mL

1.5 M Tris- HCl pH6.8: 1.25 mL SDS10% p/v: 50 μ L Acrilamida/Bis 30 %: 0.65 mL

Persulfato de NH₄ 10% (0.1 g/mL): 100 μ L

TEMED: 5 μ L

Reactivos y Soluciones:

RIPA Buffer

1% Triton X-100

0.5% de cloruro de sodio

9% SDS

5% dithiothreitol (DTT)

1mM ortovanadato de sodio

10 g fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)

30 µg de aprotinin en PBS

Buffer de muestra 5x

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8: 2.1 mL

Glicerol: 0.9 mL

SDS 10% (sólido): 0.3 mL

Azul de bromofenol: 0.36 mg

Cada 83 mL de esta preparación, se agregaron 17 mL de 2-Mercaptoetanol de preparación reciente.

Buffer de corrida pH 8.3 1x

Tris: 3.0 g, glicina: 14.4 g, SDS: 1,0 g, agua: 1000 mL

Buffer de transferencia pH 8,1- 8,4 1x

Tris: 3,0 g, glicina: 14,4 g, metanol: 200 mL, agua: 800 mL

3.4 Medición de triglicéridos en hígado

Un gramo de tejido hepático se homogeneizó con PBS pH7.4 frío, usando un homogeneizador manual. Los homogeneizados se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron para la cuantificación de TG, usando un *kit* comercial enzimático (Roche) en un autoanalizador *Hitachi Modular P800*.

3.5 Determinación de malondialdehído

Para determinar la extensión del proceso de peroxidación lipídica del TAV, se utilizó el método descrito por Ohkawa y col. (1979) [167] que permite medir el producto de reacción, malondialdehído (MDA), con el ácido tiobarbitúrico, en tejidos animales. De cada lisado de tejido (1:10 m/v) obtenido por animal se utilizó una alícuota para la determinación de proteínas por el método de Bradford [166]. A la alícuota restante se le agregaron 15 µL de SDS 8.1%; 150 µL de ácido acético 20% pH 3.5 y 175 µL de ácido tiobarbitúrico 0.8%. Se homogeneizó y se llevó a baño de agua hirviendo durante 1 h. Luego de retirar los tubos del baño de agua se procedió a enfriarlos con agua corriente durante 5 min, se centrifugaron

durante 10 min a 4000 rpm y se leyó la absorbancia del compuesto coloreado formado a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro (HACH, modelo DR5000). Paralelamente se realizó una curva patrón con tetrametoxipropano (TMP) para la determinación del MDA ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) de las muestras analizadas interpolación directa.

3.6 Citometría de flujo

3.6.1 Aislamiento de la fracción estromal vascular

A las 12 semanas, los animales fueron sacrificados para la separación del TAV y posteriormente se procesó para la obtención de la fracción del estroma vascular (SVF). Luego del sacrificio correspondiente, se procedió a la disección del TAV del animal y se colocó el tejido en placas de Petri con 2 mL de PBS pH7.4 frío para su primer procesamiento. Con la ayuda de dos bisturíes se comenzó con la primera ruptura del tejido en partes pequeñas, para facilitar la acción de la enzima colagenasa y esta mezcla se transfirió a un tubo Falcon de 15mL. Para realizar la digestión con colagenasa se siguió el método descrito por Curat y col. (2004) [168]. Brevemente, se adicionó a la mezcla colagenasa tipo II (Sigma) en una concentración de 0.8 mg/mL en solución de Hank's pH7.4 y se la dejó actuar durante 45 min en estufa a 37°C con agitación constante. Luego se adicionaron 3 volúmenes (vol) de PBS- 5%SFB para lavar y desactivar la colagenasa y el tejido digerido se pasó a través de un filtro de 100 μ . Se centrifugó a 200g 5 min y se separó la SVF de los adipocitos flotantes.

3.6.2 Citometría de Flujo de la fracción estromal vascular

Obtenida la SVF del TAV, se procedió inmediatamente a la separación de glóbulos rojos por centrifugación a 500 g durante 5 min. El remanente celular se resuspendió en PBS y se expuso a FcBLOCK (BD Bioscience) por 20 min. El número de células viables se determinó por la exclusión de azul de Tripán usando una cámara de Neubauer (dilución 1/10). Luego, 1×10^6 células se lavaron con *buffer* de lavado FACS frío (PBS-2%SFB) y se incubaron con anticuerpos marcados con fluorocromos por 45 min a 4°C. Para ello, se emplearon diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos primarios: anti- F4/80 conjugado con PECy7 (Clon BM8 Biolegend), anti- CD11c conjugado con APCCy7 (Clon N418 Biolegend) y anti-CD206 biotilado (Clon mr5d3 BioLegend). Se lavó con PBS, se centrifugó a 13000 rpm 1 min (spin max) y el *pellet* resultante se resuspendió con 100 μL de PBS. Se adicionó el anticuerpo secundario estreptavidina conjugado con PECy5 por 15 min a 4°C en oscuridad.

A las 12 semanas, se analizó la producción intracelular de MCP1 (Clon mr2h5 BioLegend). Las células fueron permeabilizadas con BD Cytotfix/Cytoperm *buffer* por 20 min a 4°C y lavadas con solución Perm/Wash 1x (BD Bioscience). Luego, se incubaron con el anticuerpo anti-MCP1 conjugado con PE 45 min a 4°C. Las muestras se lavaron, se centrifugaron a 13000 rpm 1min, se resuspendieron en PBS y examinaron usando el citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Bioscience) y finalmente se analizaron usando el programa *Flowjo* (TreeStar).

3.7 Estudios de microscopía

Los animales sacrificados a las 4, 12 y 24 semanas se perfundieron intracardiamente con PBS. Luego se tomaron muestras de los siguientes tejidos: TAV, hígado, corazón y aorta. Se fijaron en solución de paraformaldehído-PBS pH7.4 por un tiempo mínimo de 24 hs y se embebieron en parafina para la posterior tinción con hematoxilina y eosina (H&E) o para análisis de inmunofluorescencia. Las secciones de tejido se cortaron a un espesor de 5 μ , con excepción de las secciones del TAV que se cortaron a 8 μ . Para realizar los cortes se utilizó el micrótopo de la Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Histología, Universidad Nacional de Córdoba. Las secciones de tejido fueron desparafinadas por pasajes seriados con xileno y concentraciones decrecientes de etanol (100-70 %) y finalmente sometidas a rehidratación con PBS pH 7.4.

3.7.1 Hematoxilina y eosina

Las secciones de tejidos se tiñeron con H&E. Los preparados se visualizaron usando un microscopio *NIKON ECLIPSE TE-2000U* equipado con una cámara de vídeo digital (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CIBICI-CONICET). Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 400x.

3.7.2 Inmunofluorescencia

Las secciones de TAV se sometieron a permeabilización con Tritón 1% x-100 (para marcación intracelular) y al bloqueo con solución de BSA-PBS 1% durante 30-40 min en cámara húmeda. Los cortes se dejaron en contacto con los anticuerpos primarios específicos para cada antígeno en cámara húmeda a 4°C, toda la noche: anti-mouse TLR2 (dilución 1/50) marcado con PE (fluorocromo rojo) obtenido en conejo (Santacruz) y anti-mouse para MCP1 biotinilado obtenido en hámster (dilución 1/100 BioLegend). Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) para la detección de MCP1 (1/100, anti-hamster FITC). Finalmente, se procedió a la marcación con

un fluorocromo intercalante de DNA, Hoescht 33258 (2µg/mL), por 15 min en cámara húmeda. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal usando FV300 *Olympus confocal scanning microscope* (CIQUIBIQ, CONICET), tomadas a un aumento de 400x.

3.8 Estudio de corpúsculos lipídicos

3.8.1 Tinción con oil-red O

La tinción con oil-red O (ORO) es una técnica ampliamente utilizada para la coloración de lípidos neutros [169]. Con este fin, a las células adheridas sobre láminas redondas de microscopía se les retiró el sobrenadante y se las lavó cuidadosamente, ya que son de poca adherencia, con PBS pH7.4 a T°amb. Las células se fijaron en PBS-formalina 3.5% por 15 min a T°amb. Luego de dos lavados con PBS, se adicionó una solución de ORO preparada y filtrada en el momento, a partir de la mezcla en partes iguales de la solución madre de ORO (0.3% en isopropanol) y PBS. Se incubó con agitación constante durante 1 min, se lavó 1 vez con isopropanol al 30% y 4-6 veces con PBS y finalmente se procedió a su montaje con glicerol 70% (imágenes en campo claro). Los preparados se visualizaron con el microscopio *NIKON ECLIPSE TE-2000U* equipado con una cámara de video digital y las imágenes fueron tomadas a un aumento de 400x.

3.8.2 Tinción con Bodipy

Alternativamente, los corpúsculos lipídicos de las células adiposas se marcaron con el colorante fluorescente Bodipy 493/503 (Molecular Probes). Luego de la fijación de las células con PBS-formalina 3.5% (15 min) y tres lavados posteriores con PBS, se adicionó una cantidad de 100 µL por pozo del colorante diluido en PBS (1/10000) por 10 min. Luego de dos lavados con PBS, se procedió al montaje con medio *VECTASHIELD-DAPI* [169, 170]. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal con FV300 *Olympus confocal scanning microscope* con aumentos de 200 y 600x.

3.8.3 Extracción de lípidos neutros

Brevemente, las células se fijaron con formalina-PBS 3.5% pH 7.4 por 15 min y se lavaron con PBS e isopropanol-PBS 30%. Se adicionó una mezcla de 250 µL de PBS con 250 µL de la solución madre de ORO (filtrada dos veces) a cada pozo de células durante 1 min y agitación constante. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con PBS y dos lavados finales con isopropanol al 30%. Se adicionaron 70 µL de isopropanol al 100% durante 30 min (agitación constante) y se recolectaron 50 µL, los cuales fueron transferidos

a una placa de 96 pozos para la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 490 nm usando un lector de ELISA *Microplatereader* (Bio-Rad). Los valores de absorbancias son proporcionales a la cantidad de lípidos extraídos con ORO.

3.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA I) cuando la variable fue el tratamiento y ANOVA de dos vías (ANOVA II) cuando las variables fueron tratamiento y tiempo, o cantidad de parásitos (experimentos *in vitro*). Para comparar entre sí los diferentes grupos, se utilizaron los post test de Newman-Keuls y de Bonferroni para el análisis comparativo de las medias. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM, utilizando el programa *GraphPad Prism 5.0, Inc.*

RESULTADOS

ESTUDIOS *IN VIVO*

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA

4.1.1 Impacto de la infección con *T. cruzi* y la dieta en el desarrollo de obesidad e insulino resistencia, efectos metabólicos y alteraciones cardiovasculares:

4.1.1.1 Parámetros morfométricos

El análisis de estos parámetros a las 4, 12 y 24 semanas nos permitió comprobar que nuestro modelo crónico de tratamiento con dieta moderada en grasas, fructosa y STZ, era capaz de inducir el desarrollo de obesidad crónica e insulino resistencia periférica en los animales tratados. Por ANOVA II, se hallaron diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos experimentales. El valor del estadístico F para el tratamiento (DC, DO, DO+I y DC+I) fue $F=27.23$ $p<0.0001$. También se encontraron diferencias estadísticas relacionadas al tiempo de análisis (4, 12 y 24 semanas), $F=13.41$ $p<0.0001$ y en la interacción entre ambos factores, $F=4.748$ $p<0.002$. Asimismo, por ANOVA II obtuvimos diferencias significativas en el diámetro de cintura debida a los tratamientos ($F=14.90$ $p<0.0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo de estudio ($F=2.288$ $p=0.1116$) ni en la interacción entre ambos factores ($F=1.217$ $p=0.3126$). El IMC mostró diferencias estadísticas atribuibles a los grupos experimentales, al tiempo y a la interacción de ambas variables: $F=54.58$ $p<0.0001$, $F=49.25$ $p<0.0001$, $F=21.88$ $p<0.0001$, respectivamente. Debido a las diferencias estadísticas observadas en dichos parámetros morfométricos, se realizó el test de Bonferroni para identificar las diferencias entre los grupos. El grupo DO desarrolló un incremento de PC e IMC, significativo estadísticamente respecto al grupo DC (Figura 10A-C). Mediante ANOVA II se analizó la variación de TAV (%) entre los grupos a las 12 y 24 semanas. Se demostraron diferencias estadísticas consecuentes al tratamiento aplicado, $F=28.66$ $p<0.0001$ y tiempo de tratamiento, $F=8.082$ $p=0.0073$. Sin embargo, la interacción entre ambos factores no mostró diferencias estadísticas ($F=1.052$ $p=0.3814$). Por el test de Bonferroni se observó un aumento significativo del % TAV en el grupo DO comparado al grupo DC (Figura 10D).

La presencia del *T. cruzi* en el grupo DO+I protegió de las alteraciones morfométricas inducidas por la dieta, mostrando una disminución significativa en todos los parámetros analizados respecto al grupo DO. Además, a pesar de la dieta, no se encontraron diferencias estadísticas apreciables en relación al grupo DC+I (Figura 10A-D).

En la figura 10E, se muestran imágenes representativas de animales de los distintos grupos, donde pueden discriminarse las variaciones de TAV. Es importante señalar que el

incremento de los parámetros morfométricos puede ser atribuido a la composición de la dieta utilizada, ya que no se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de alimento consumido entre los animales que recibieron la dieta moderada en grasas y los que recibieron la dieta estandar. La cromatografía de gases reveló que la administración de la dieta moderada en grasas utilizada para los grupos DO y DO+I produjo un incremento de ácidos grasos saturados en circulación, particularmente ácido palmítico (C16) (Figura 11).

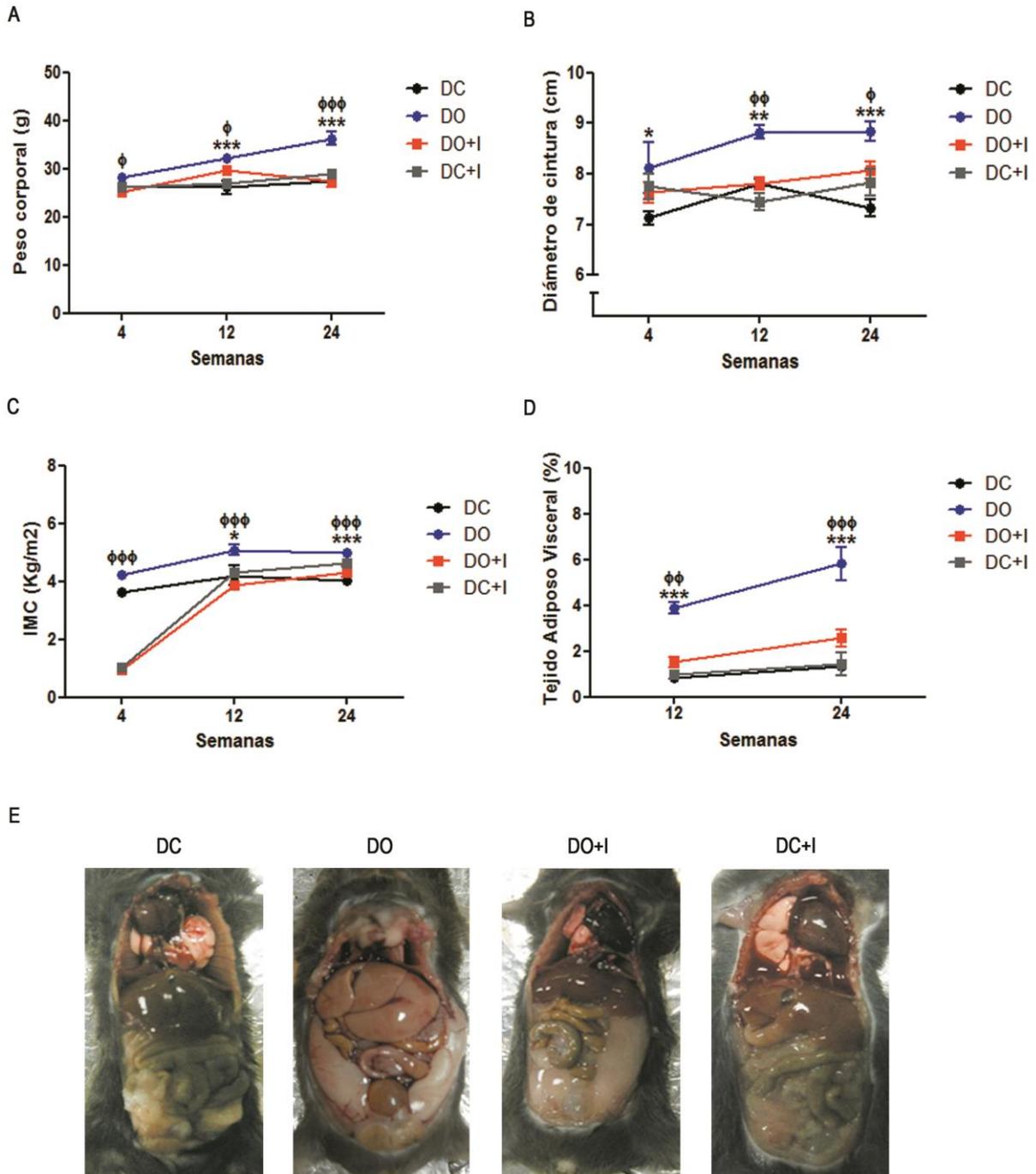


Figura 10. Efecto de la obesidad inducida por dieta y la infección con *T. cruzi* sobre: (A) la variación de peso corporal, (B) el diámetro de cintura, (C) el IMC y (D) la variación de tejido adiposo visceral, expresada en %. Los cambios en los parámetros morfométricos se estudiaron a las 4, 12 y 24 semanas. (E) muestra imágenes representativas de un animal de los distintos grupos a las 24 semanas. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los tratamientos DC (control, líneas negras), DO (dieta obesogénica, líneas azules), DO+I (dieta obesogénica+infección, líneas rojas) y DC+I (infección, línea gris). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ indican la comparación entre los grupos DC y DO; ϕ $p < 0,05$ $\phi\phi$ $p < 0,01$ $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ indican la comparación de DO respecto al grupo DO+I. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo mediante el test ANOVA II. Se empleó un $n = 9-10$ animales por grupo para cada tiempo.

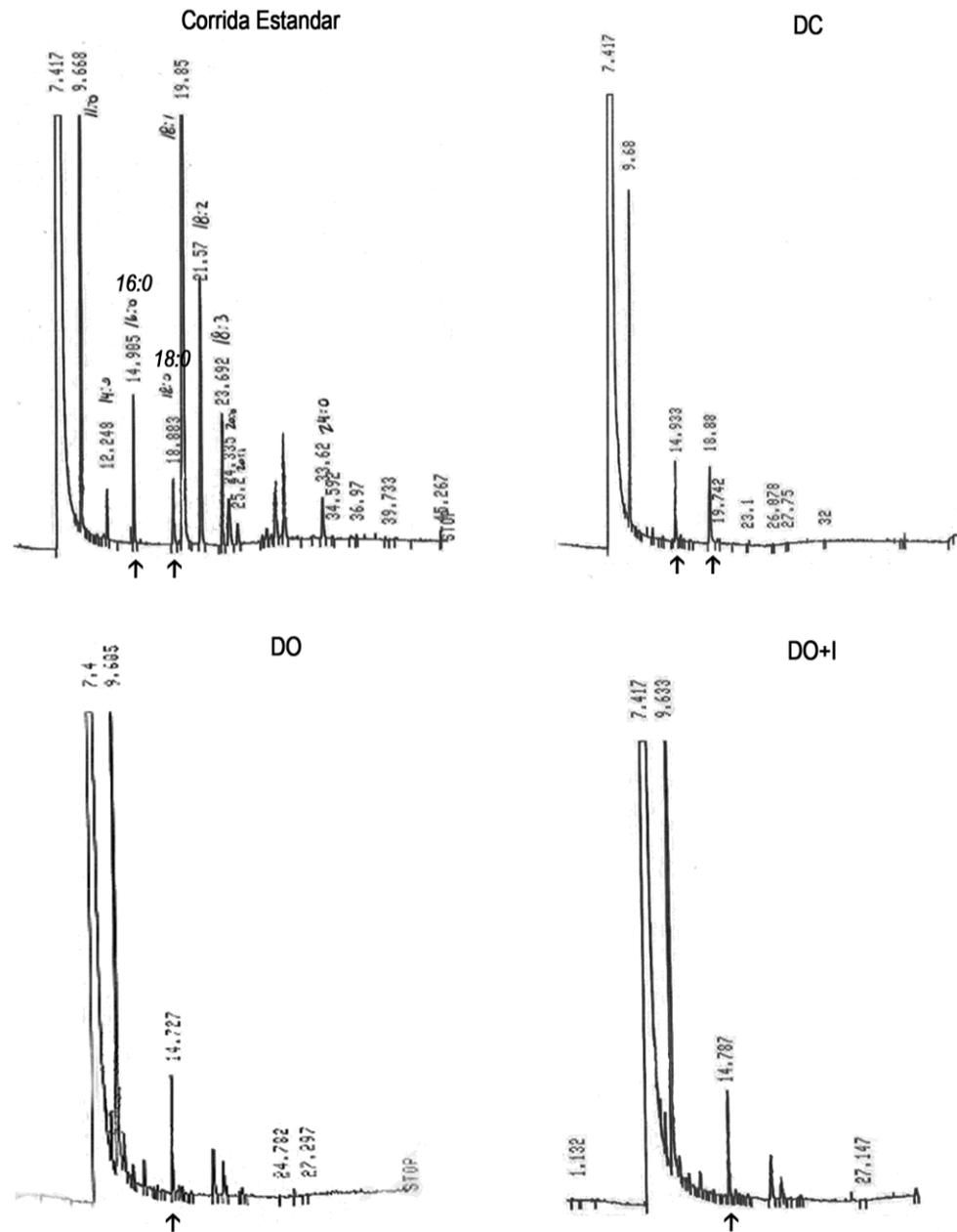


Figura 11. Perfil cualitativo de ácidos grasos plasmáticos por cromatografía gaseosa en grupos: DC (control), DO (dieta obesogénica) y DO+I (dieta obesogénica+infección), a las 24 semanas. La corrida estandar muestra las líneas correspondientes a diferentes ácidos grasos. 16:0 (16 carbonos, C) indica el ácido palmítico (Ac. P) y 18:0 (18C) el ácido esteárico (Ac. E). Las flechas en el pico con valor aproximado 14, indican la presencia de Ac.P (DC, DO, DO+I), mientras que, las flechas con valor de 18, indican la presencia de Ac. E (DC).

4.1.1.2 Efecto de la señalización de TLR4 sobre los parámetros morfométricos en el modelo de obesidad e infección

Con el fin de analizar la participación de la señalización mediada por TLR4, decidimos poner en marcha nuestro modelo de obesidad inducido por dieta e infección, en animales que carecen de la expresión de TLR4 (TLR4 $-/-$). De esta manera, se estudiaron en cuatro grupos experimentales: DC $-/-$, DO $-/-$, DO+I $-/-$ y DC+I $-/-$, el PC a las 4, 12 y 24 semanas y la variación de TAV a las 12 y 24 semanas (Figura 12). Los animales DC+I tuvieron una tasa de mortalidad del 100% entre los 25-35 días post infección, por lo que no pudieron ser estudiados a las 12 y 24 semanas.

En el ANOVA II se encontraron diferencias en el PC entre los distintos grupos, $F=12.06$ $p=0.0008$ y variaciones para el factor tiempo ($F=22.06$ $p<0.0001$) e interacción de ambos factores ($F=6.871$ $p=0.0024$). Sin embargo, la figura 12A muestra que los animales DO $-/-$ estuvieron protegidos del incremento de PC hasta las 24 semanas, a diferencia de los animales WT ($p<0.05$ WT vs. TLR4 $-/-$) (Figura 10A) y sólo a este tiempo mostraron un aumento de peso significativo respecto al grupo DC $-/-$ y DO+I $-/-$. En la figura 12B se muestra la variación de TAV (%) entre los grupos experimentales. Se hallaron diferencias estadísticas en relación a los tratamientos administrados a cada grupo, $F=1.824$ $p=0.0002$ y factor tiempo $F=0.5280$ $p=0.0260$. El test de Bonferroni demostró que la ausencia de señalización de TLR4 no fue capaz de proteger del incremento de TAV a los animales DO $-/-$ y DO+I $-/-$, mostrando diferencias significativas comparados al grupo DC $-/-$. Este fenómeno fue diferente al observado en los animales WT, ya que el grupo DO fue el único en desarrollar un aumento significativo de TAV respecto a DC y DO+I (Figura 10D).

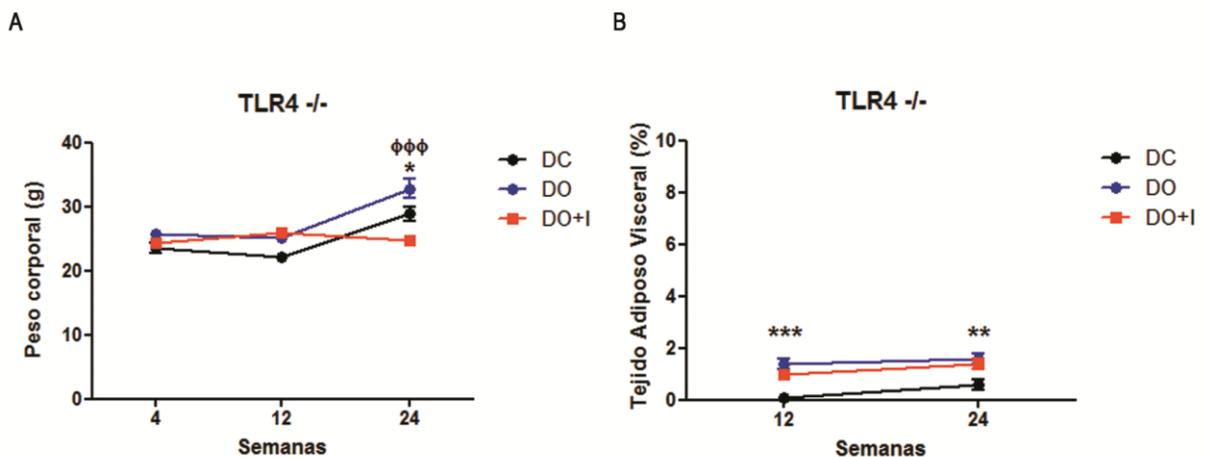


Figura 12. Efecto de la ausencia de TLR4 en el modelo de obesidad e infección con *T. cruzi* sobre: A) el peso corporal y B) la variación de tejido adiposo visceral. Los datos de los tratamientos DC $-/-$ (control, líneas negras), DO $-/-$ (dieta obesogénica, líneas azules), DO+I $-/-$ (dieta obesogénica+infección, líneas rojas) se expresan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ indican la comparación entre los grupos DC $-/-$ y DO $-/-$; $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ indica la comparación de DO $-/-$ respecto al grupo DO+I $-/-$. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo mediante el ANOVA II. $n = 6-8$ animales por grupo para cada tiempo estudiado.

4.1.1.3 Estudio del metabolismo de glúcidos e insulino resistencia periférica

El análisis de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina a las 4, 12 y 24 semanas, nos permitió estudiar el efecto de la dieta y la infección en la homeostasis del metabolismo de glúcidos en el período agudo y crónico. El índice HOMA-IR fue calculado para estudiar el estado de insulino resistencia periférica en los grupos (Figura 13).

El ANOVA II aplicado para cada parámetro arrojó diferencias estadísticas entre los grupos. En los valores de glucosa, estas diferencias se atribuyeron al factor tratamiento, $F=10.87$ $p<0.0001$. El factor tiempo ($F=2.881$ $p=0.0654$) y la interacción entre ambos factores ($F=1.569$ $p=0.1680$), no fueron significativos. En los valores de insulina, se obtuvieron diferencias estadísticas en el factor tratamiento, $F=3.957$ $p=0.0172$ y en el factor interacción, $F=4.220$ $p=0.0034$. Sin embargo, el factor tiempo no mostró diferencias estadísticas relevantes ($F=0.02955$ $p=0.9709$). Asimismo, en el índice HOMA-IR las diferencias estadísticas se debieron a los factores tratamiento e interacción, con $F=3.696$ $p=0.0213$ y $F=4.675$ $p=0.0015$, respectivamente. El factor tiempo no mostró diferencias ($F=0.9242$ $p=0.4069$).

El post test de Bonferroni, mostró un aumento significativo en los niveles de glucemia en el grupo DO respecto a DC, en todas las semanas de estudio (Figura 13A). El incremento de glucemia se acompañó de una hiperinsulinemia significativa e IR periférica, en comparación a DC, a partir de las 12 semanas (Figura 13B, C). La presencia del parásito en el grupo DO+I, no generó diferencias estadísticas en los valores de glucosa respecto a DO durante la etapa crónica de la infección (12 y 24 semanas), aunque sí durante la etapa aguda, observándose una disminución significativa en los animales DO+I (4 semanas). De manera interesante a las 4 semanas, el grupo DO+I desarrolló una IR periférica aguda respecto a DO y DC+I. Superada esta fase y a pesar de los niveles incrementados de glucemia respecto a DC, los animales mostraron niveles de insulina y HOMA-IR significativamente menores respecto a DO, sugiriendo que la insulina sería insuficiente para regular los niveles de glucosa y reflejando una posible progresión a diabetes en estos animales (Figura 13A-C).

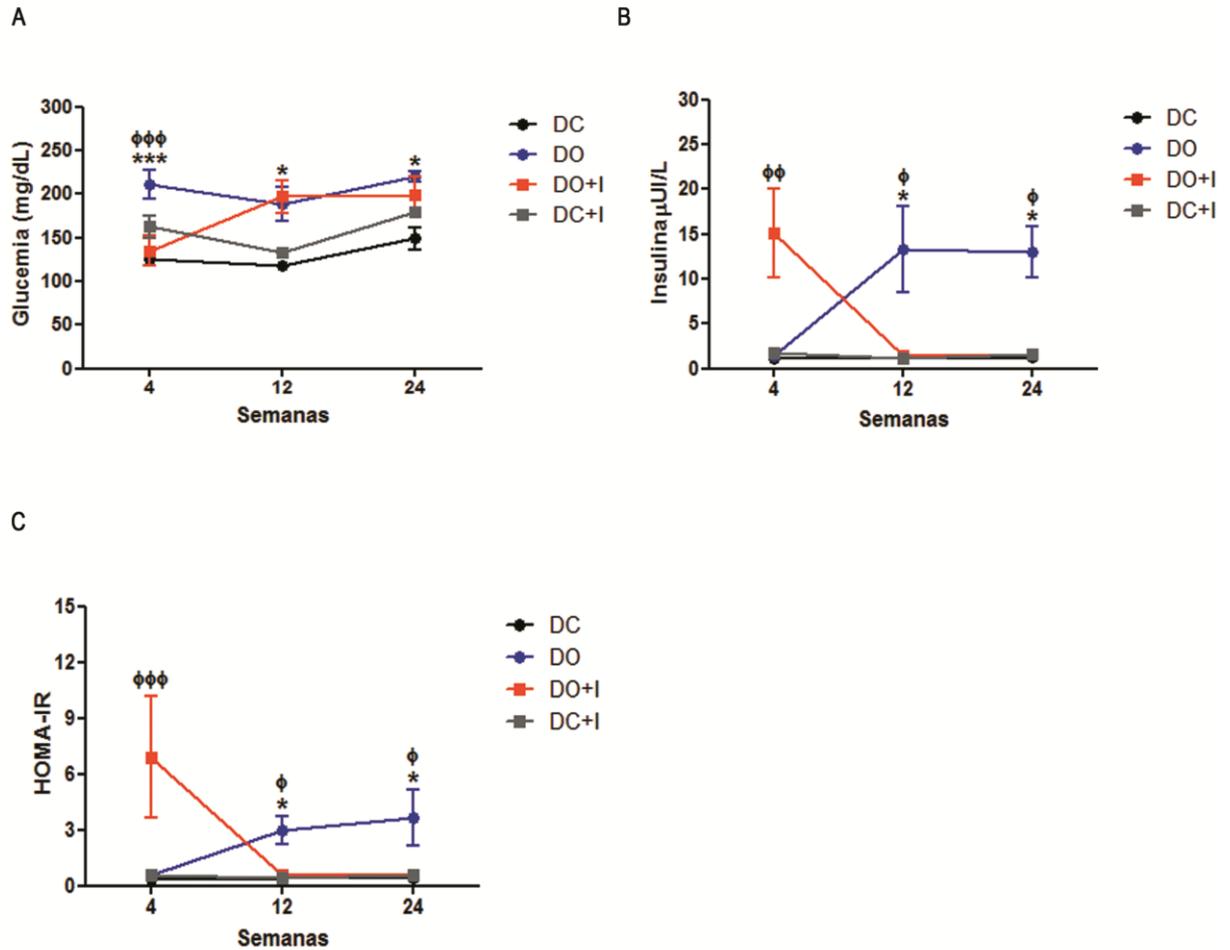


Figura 13. Influencia del tratamiento obesogénico y la infección con *T. cruzi* sobre el metabolismo de glucídicos e insulino resistencia periférica. (A) valores de glucosa, (B) valores de insulina plasmática y (C) valores del índice HOMA-IR. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los tratamientos DC (control, líneas negras), DO (dieta obesogénica, líneas azules), DO+I (dieta obesogénica+infección, líneas rojas) y DC+I (infección, línea gris). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ indican la comparación entre los grupos DC y DO; ϕ $p < 0,05$ $\phi\phi$ $p < 0,01$ $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ indican la comparación de DO respecto a DO+I. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo mediante el ANOVA II. $n = 9-10$ animales por grupo y para cada tiempo estudiado.

4.1.1.4 Efecto de la infección parasitaria y la dieta sobre el metabolismo de lípidos y las alteraciones cardiovasculares

El metabolismo de lípidos a nivel sistémico se evaluó a partir de la determinación de triglicéridos y colesterol total, del análisis del perfil cualitativo de lipoproteínas y de los niveles de apoB100 (Figura 14). Las alteraciones cardiovasculares a nivel histológico, se analizaron en cortes de corazón y aorta (Figura 15 y 16).

El análisis de triglicéridos por ANOVA II mostró diferencias estadísticas en los factores tratamiento ($F=35.16$ $p<0.0001$), tiempo ($F=12.29$ $p<0.0001$) y en la interacción de ambos factores ($F=8.759$ $p<0.0001$). Los resultados para los niveles de colesterol fueron similares, con diferencias estadísticas ligadas a los grupos experimentales ($F=15.20$ $p<0.0001$), al tiempo de estudio ($F=3.662$ $p=0.0321$) y a la interacción de ambas variables ($F=4.008$ $p=0.00021$). Las figuras 14A y 14B muestran un incremento significativo (test de Bonferroni) en los valores plasmáticos de triglicéridos y colesterol total en el grupo DO con respecto a los grupos DC y DO+I, a las 4 y 24 semanas post tratamiento. No se demostraron diferencias estadísticas entre los grupos infectados DO+I y DC+I.

Sin embargo, a pesar de que el parásito indujo una mejora en los niveles sistémicos de lípidos, el análisis del perfil de lipoproteínas mostró un patrón alterado de las mismas, con aumento de LDL y disminución de HDL, tanto en el grupo DO como en los grupos DO+I y DC+I (Figura 14C) a las 24 semanas. Adicionalmente, se analizaron los niveles de apoB100 por ANOVA I ($F=4.799$ $p=0.0126$) y por el post test de Bonferroni. El incremento significativo de los niveles de apoB100 observado en los grupos DO, DO+I y DC+I respecto a DC, es sugestivo de la presencia de partículas LDL pequeñas y densas (Figura 14C).

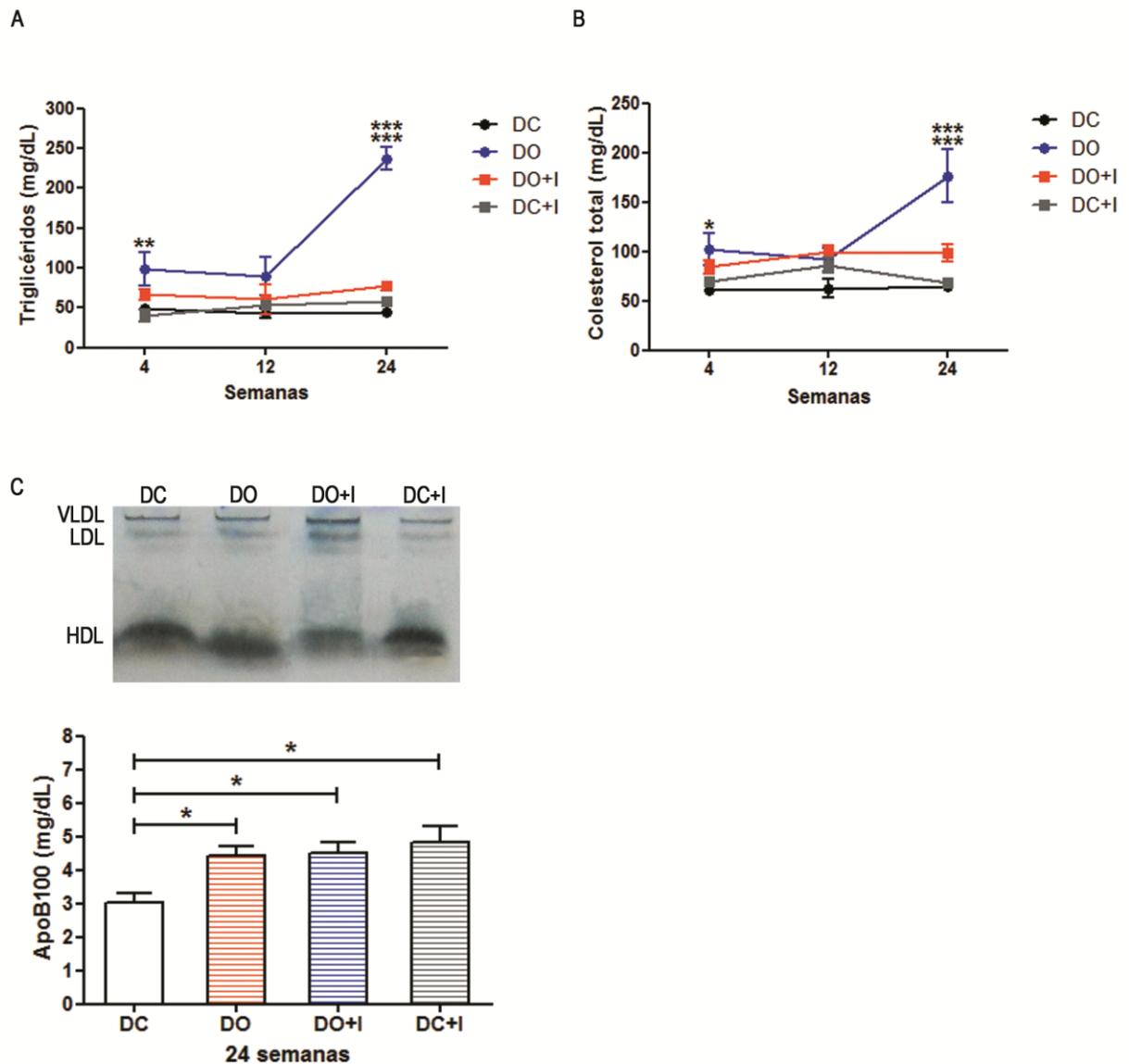


Figura 14. Efecto de la dieta y la infección con *T. cruzi* sobre las alteraciones lipídicas y lipoproteicas en el modelo crónico de obesidad. (A) Triglicéridos, (B) Colesterol total. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los tratamientos DC (control, líneas negras), DO (dieta obesogénica, líneas azules), DO+I (dieta obesogénica+infección, líneas rojas) y DC+I (infección, líneas grises). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ indican la comparación entre los grupos DC y DO; ϕ $p < 0,05$ $\phi\phi$ $p < 0,01$ $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ indican la comparación de DO respecto al grupo DO+I. $n = 8-10$ animales por grupo para cada tiempo estudiado. (C) Perfil cualitativo de lipoproteínas en gel de poliácridamida: VLDL, LDL y HDL y cuantificación de la apoB100 a las 24 semanas (ANOVA I). $n = 5-6$ animales por grupo.

Las imágenes H&E de corazón y aorta torácico abdominal mostraron diferencias histológicas entre los grupos experimentales. En corazón, la combinación de la dieta, fructosa y STZ indujo la acumulación de lípidos ectópicos a las 12 semanas en el grupo DO. Si bien, la presencia adicional del parásito en el grupo DO+I, resultó en la disminución del

depósito lipídico inducido por la dieta, este indujo un aumento en el número de células infiltrantes en dicho tejido (Figura 15). Resultados similares se encontraron en las imágenes de aorta (Figura 16). El grupo DO se caracterizó por disturbios en la arquitectura epitelial y por la presencia de adipocitos hipertrofiados en la adventicia. En el grupo DO+I, se hallaron adipocitos adventiciales de menor contenido lipídico, similares a los controles y un incremento en la cantidad de infiltrado celular en la adventicia. Entre los grupos infectados, imágenes similares fueron apreciadas tanto a nivel cardíaco como vascular.

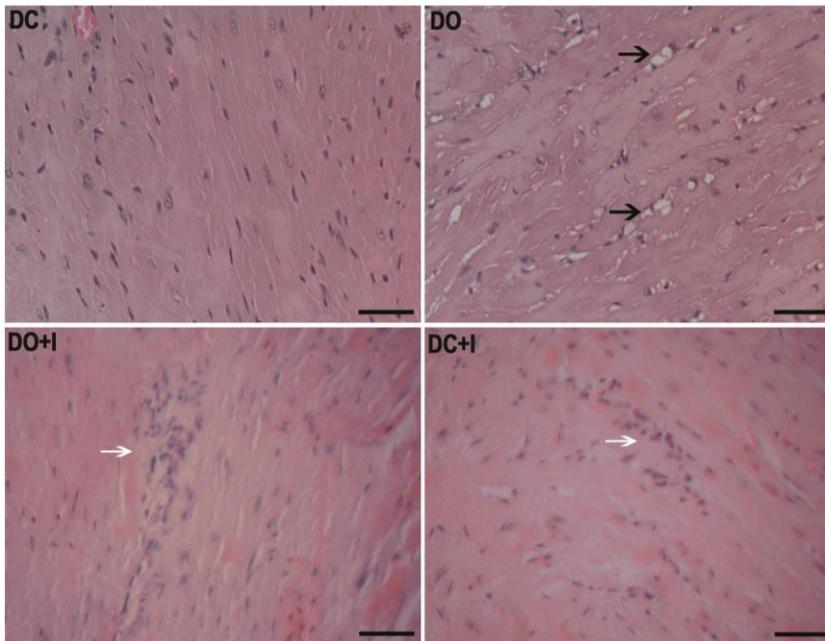


Figura 15. Microfotografías de tejido cardíaco coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta obesogénica), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección). Barra de calibración: 40 μ m. Aumento 400x. Las flechas negras indican acúmulo de lípidos ectópicos intracardíacos; las flechas blancas muestran presencia de infiltrado celular.

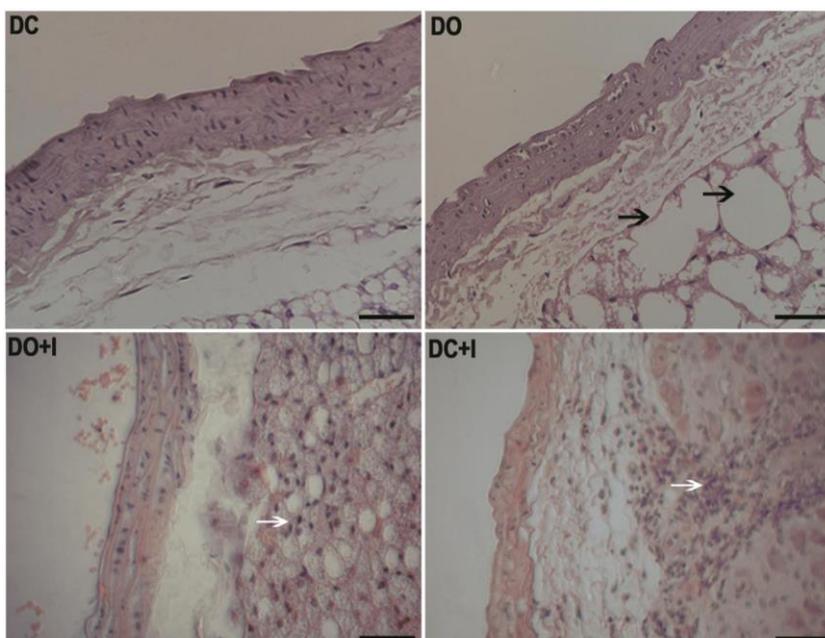


Figura 16. Microfotografías de aorta torácico abdominal con H & E de animales: DC (control), DO (dieta obesogénica), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección). Barra de calibración: 40 μ m. Aumento 400x. Las flechas negras indican hipertrofia de células adiposas en adventicia; las flechas blancas muestran presencia de infiltrado celular.

4.1.1.5 Efecto de la señalización de TLR4 en la homeostasis metabólica de glucosa y lípidos

Para evaluar el papel de TLR4 sobre la homeostasis metabólica, se analizaron los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol total en los animales -/- a las 4, 12 y 24 semanas (Figura 17).

El análisis de varianza (ANOVA II) aplicado no mostró diferencias estadísticas en los valores de glucosa, triglicéridos y colesterol total entre los grupos experimentales (Figura 17A, B, C). Al comparar los niveles de glucosa, el valor del estadístico F para el factor tratamiento (DC-/-, DO-/- y DO+I-/-) fue $F=1.318$ $p=0.2910$, para el factor tiempo fue $F=1.058$ $p=0.3667$ y para el factor interacción $F=0.6046$ $p=0.6640$. Del mismo modo, no se mostraron diferencias estadísticas en los niveles de triglicéridos debidas al tratamiento ($F=2.922$ $p=0.0783$), al tiempo ($F=1.240$ $p=0.3118$), ni a la interacción de ambos factores ($F=0.4698$ $p=0.7572$). Los niveles de colesterol tampoco mostraron diferencias significativas (tratamiento $F=2.838$ $p=0.0587$, tiempo $F=0.4843$ $p=0.6229$, interacción $F=1.088$ $p=0.3877$). Esto sugeriría que la ausencia de TLR4 protege de los cambios metabólicos inducidos en el contexto de obesidad e infección en relación a los WT (Figura 17 vs. Figura 14, $p<0.05$). No se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de la apoB100 entre los grupos TLR4 -/-, pero si en comparación con los WT (Figura 17D vs. Figura 14C, $p<0.01$).

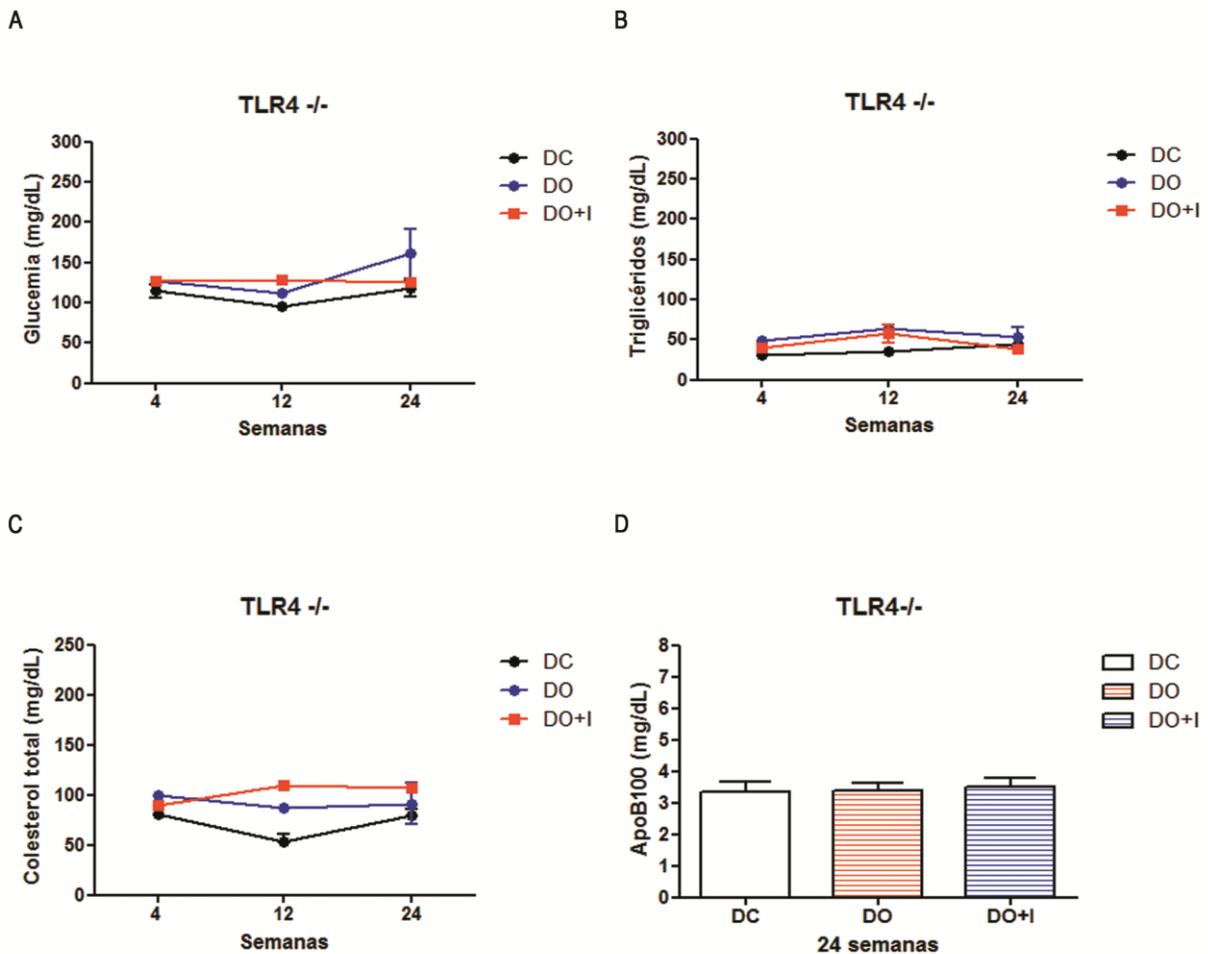


Figura 17. Efecto de la ausencia de señalización de TLR4 en el modelo de obesidad e infección sobre los niveles plasmáticos de: (A) glucosa, (B) triglicéridos, (C) colesterol total y (D) apoB100. DC -/- (control, líneas negras), DO -/- (dieta obesogénica, líneas azules) y DO+I -/- (dieta obesogénica+infección, líneas rojas). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos mediante el ANOVA II, con $p > 0.05$. $n = 6-8$ animales por grupo para cada tiempo.

4.1.1.6 Efecto de la infección con *T. cruzi* y la dieta sobre el desarrollo de alteraciones hepáticas

Analizadas las repercusiones de la dieta y la infección a nivel cardíaco, decidimos centralizarnos en el estudio de dicha influencia en el tejido hepático. Para ello, se estudiaron cortes histológicos de hígado con tinción H&E a las 12 semanas (Figura 18). La figura 18 muestra diferencias histológicas apreciables entre los diferentes grupos. Encontramos que el grupo DO desarrolló tempranamente esteatosis hepática mixta, condición asociada a obesidad e IR. El hígado de estos animales presentó macro y micro vesículas lipídicas y ausencia de focos inflamatorios. Similarmente a lo observado en corazón y aorta, en DO+I, la presencia del parásito disminuyó considerablemente el depósito de grasa a nivel hepático. Sin embargo, las imágenes revelaron la presencia de focos inflamatorios, con un

número considerable de células infiltrantes, favoreciendo el desarrollo de una esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

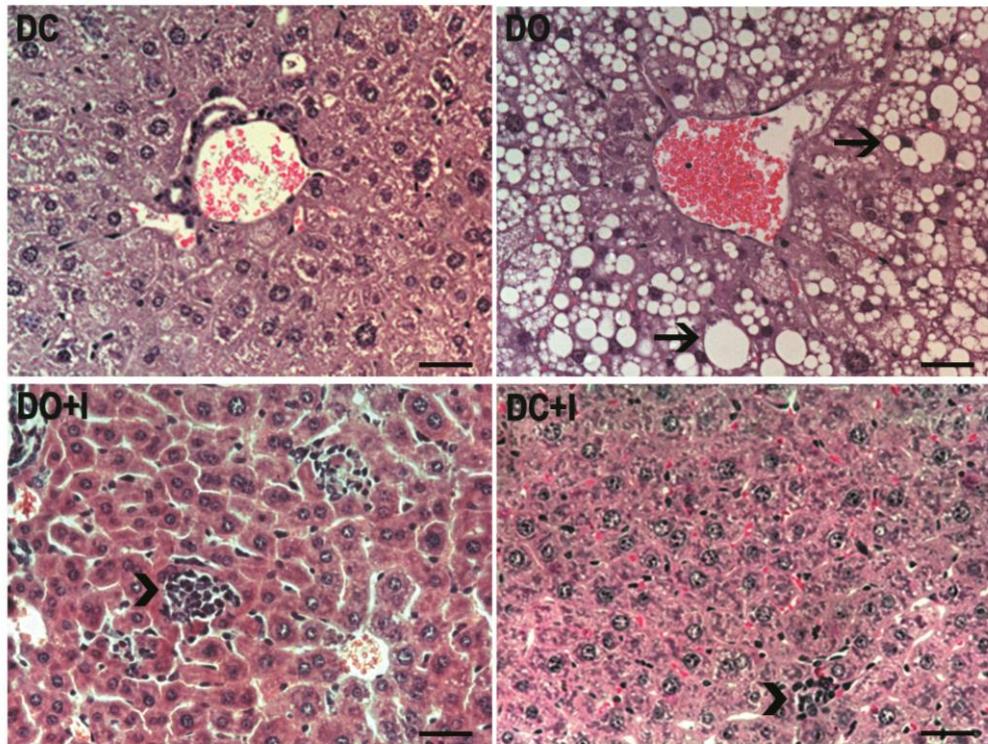
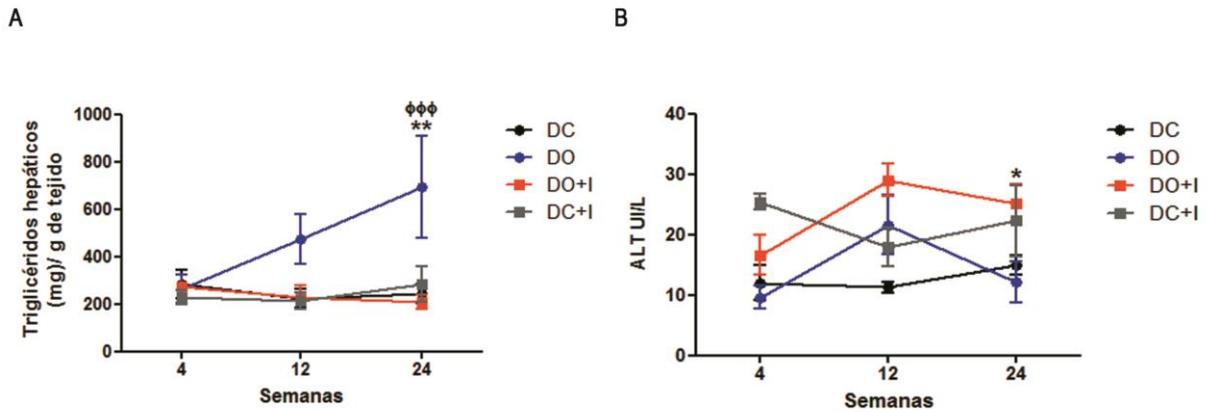


Figura 18. Microfotografías de tejido hepático coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta obesogénica), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección). Barra de calibración: 40 µm. Aumento 400x. Las flechas negras indican acúmulo de lípidos ectópicos en hígado; las cabezas de flechas negras muestran la presencia de focos inflamatorios.

Posteriormente, decidimos cuantificar triglicéridos hepáticos por gramo de tejido (Figura 19). Los resultados no mostraron diferencias estadísticas por ANOVA II en los factores tiempo ($F=2.849$ $p=0.0697$) e interacción ($F=1.593$ $p=0.1745$). Sin embargo, se hallaron diferencias estadísticas dadas por el factor tratamiento, $F=3.380$ $p=0.0274$. En la figura 19A pudimos observar que en el grupo DO, la cantidad de triglicéridos hepáticos incrementó significativamente respecto a DC ($p<0.001$) y DO+I ($p<0.01$) a las 24 semanas. Los niveles plasmáticos de transaminasas (Figura 19B) mostraron diferencias estadísticas sólo debido al factor tratamiento ($F=5.318$ $p=0.0026$) con un aumento significativo de ALT en el grupo DO+I comparado a DO, a las 24 semanas.



4.1.1.7 Efecto de la infección con *T. cruzi* y la dieta sobre el desarrollo de alteraciones hepáticas en animales TLR4 -/-

El dosaje de triglicéridos hepáticos en animales TLR4 -/- fue realizado para evaluar si la ausencia de este receptor era capaz de proteger del desarrollo de esteatosis hepática en nuestro modelo experimental de obesidad (Figura 20).

De igual modo que lo realizado para los animales WT, los triglicéridos hepáticos y los niveles de ALT fueron cuantificados y analizados por ANOVA II. Observamos diferencias estadísticas en los niveles de triglicéridos intrahepáticos debido a los tratamientos, $F=19.40$ $p=0.0002$. No se mostraron diferencias debidas al factor tiempo ($F=0.1150$ $p=0.7409$), ni a la interacción de los factores tratamiento/ tiempo ($F=0.06683$ $p=0.9357$). El post test de Bonferroni demostró un incremento significativo en el acúmulo de triglicéridos hepáticos en el grupo DO-/- respecto a los grupos DC -/- y DO+I -/- a las 12 y 24 semanas (Figura 20A). Por otro lado, no se hallaron diferencias estadísticas por ANOVA II en los niveles plasmáticos de ALT entre los grupos experimentales, a diferencia de lo ocurrido en los animales WT (Figura 20B vs. Figura 19B, $p>0.05$).

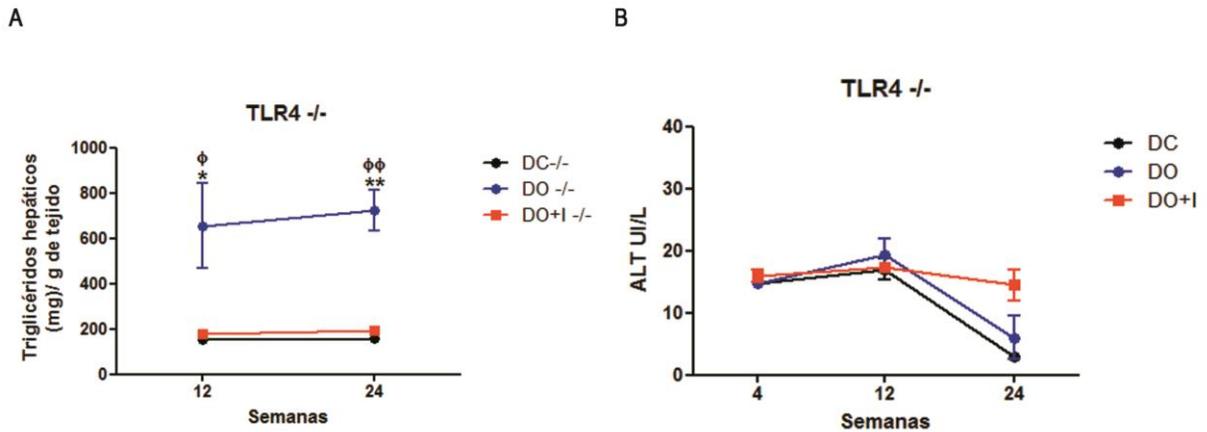


Figura 20. Efecto de la ausencia de TLR4 sobre los niveles de: (A) triglicéridos obtenidos por gramo de tejido hepático y (B) la actividad de ALT. Los datos se expresan como la media \pm SEM de los tratamientos DC -/- (control, líneas negras), DO -/- (dieta obesogénica, líneas azules) y DO+I -/- (dieta obesogénica+infección, líneas rojas). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ indican la comparación entre los grupos DC -/- y DO -/-; ϕ $p < 0,01$ $\phi\phi$ $p < 0,001$ indican la comparación de DO -/- y DO+I -/-. $n = 5-7$ animales por grupo.

4.1.2 Estudio de receptores de la inmunidad innata y caracterización de macrófagos infiltrantes en TAV

4.1.2.1 Efecto de la infección con *T. cruzi* y la dieta sobre la histomorfología del TAV, la expresión local de receptores TLR2 y CD36 y la peroxidación lipídica

Con el fin de evaluar la repercusión crónica de la infección y la dieta en la histomorfología del TAV, se analizaron cortes de tejido de los distintos grupos experimentales a las 24 semanas (Figura 21). El grupo DO presentó alteraciones características del TA disfuncional obeso, con hipertrofia de células adiposas y formación de estructuras tipo corona (CLS). Las CLS se forman por la presencia de adipocitos necrosados y la disposición de células inmunes, principalmente macrófagos, a su alrededor. Respondiendo al patrón ya encontrado para los demás tejidos, la infección con *T. cruzi* fue capaz de provocar una disminución del contenido lipídico y por consiguiente del tamaño celular, así como también, un incremento en el infiltrado celular y formación de CLS.

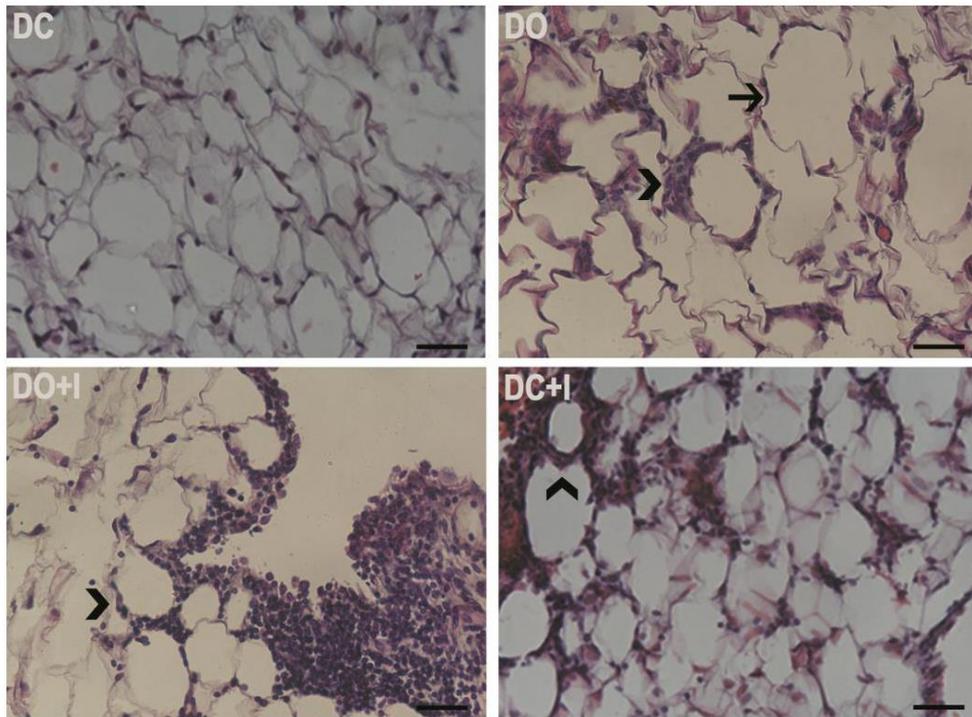


Figura 21. Microfotografías de tejido adiposo visceral coloreadas con H&E de animales: DC (control), DO (dieta obesogénica), DO+I (dieta obesogénica + infección) y DC+I (infección). Barra de calibración: 50 μ m. Aumento 400x. Las flechas negras indican células adiposas hipertrofiadas; las cabezas de flecha muestran presencia de CLS y focos inflamatorios.

Posteriormente, decidimos estudiar la expresión proteica de receptores de la inmunidad innata que podrían estar involucrados en el reconocimiento de PAMPs y/o DAMPs presentes en este contexto. En primer lugar, nos focalizamos en el estudio de TLR2 en los grupos infectados: DO+I y DC+I.

La figura 22A muestra una imagen representativa de la expresión del receptor TLR2 conjugado con PE (rojo) en TAV de animales DO+I y DC a las 24 semanas. Para comprobar la posible diferencia en la expresión de este receptor entre los grupos infectados (DO+I y DC+I), se realizó el análisis por western blot a las 24 semanas y la cuantificación de TLR2 por *ImageJ*.

El ANOVA I reveló la existencia de diferencias estadísticas debidas al tratamiento ($F=18.25$ $p=0.0005$). Los resultados de la figura 22B muestran diferencias estadísticas entre los grupos DO+I y DC+I ($p = 0.05$) y entre DC+I y DC ($p = 0.05$).

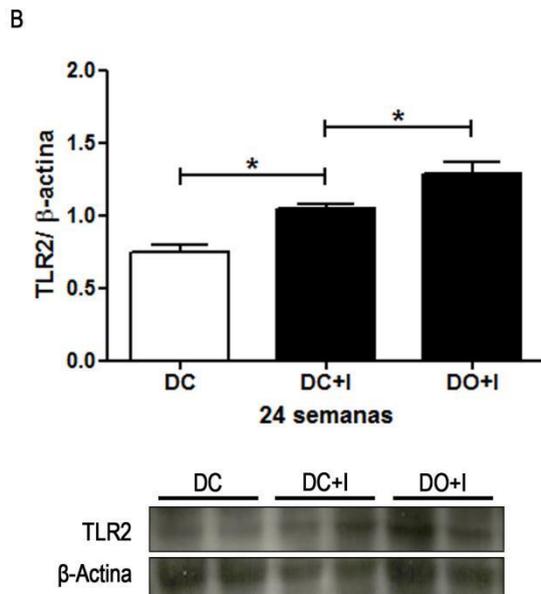
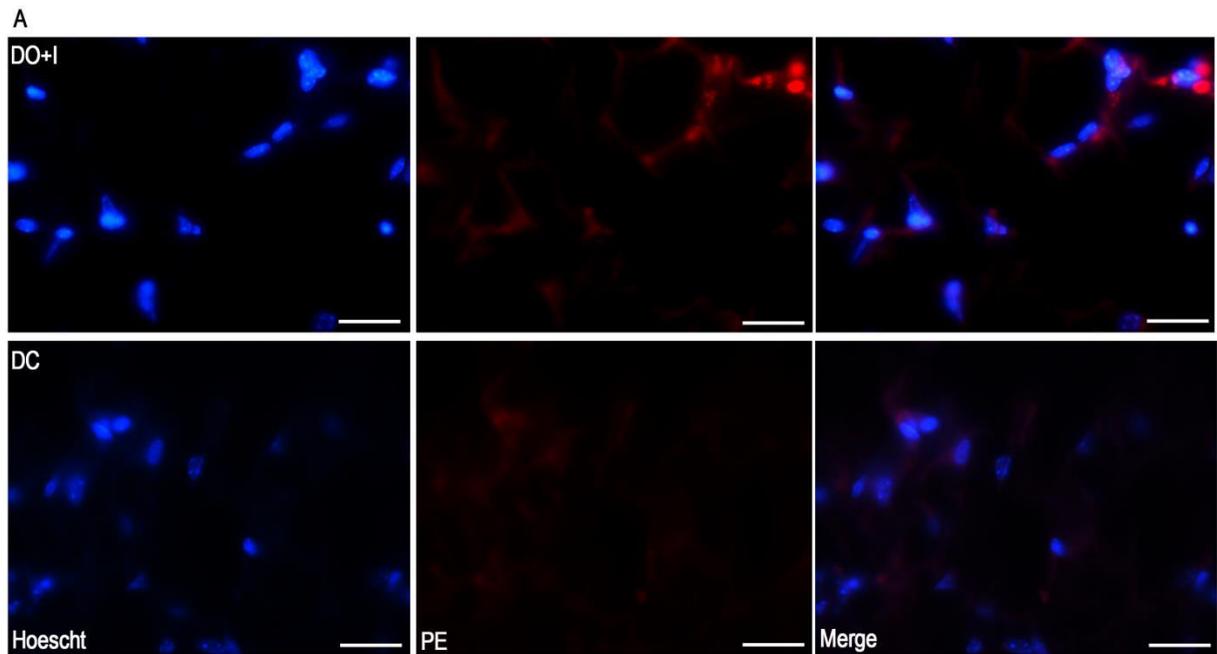


Figura 22. Expresión proteica de TLR2 en tejido adiposo visceral a las 24 semanas. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de TLR2 en TAV de animales DO+I (dieta obesogénica+infección) y DC (control). Los cortes fueron marcados con anticuerpo anti-TLR2 conjugado con PE (rojo) y los núcleos fueron visualizados con Hoescht (azul). Barra de calibración=50 μ m. Amplificación 400x. (B) Western blot para TLR2 en lisados de tejido adiposo visceral de animales DC (control, barra blanca), DC+I (infección, barra negra) y DO+I (dieta obesogénica+infección, barra negra). Se utilizó β -actina como control de carga. Los datos son representativos de dos experimentos con n=2. * $p < 0,05$ indica diferencia significativa entre los grupos DC+I vs. DC y DO+I vs DC+I.

El análisis de CD36 en TAV a las 24 semanas (Figura 23), mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=17.83$ $p=0.0093$). Los animales que recibieron dieta obesogénica presentaron un aumento significativo de este receptor con respecto a sus controles (DO vs. DC y DO+I vs. DC+I) pero este incremento fue similar entre ambos grupos (DO vs. DO+I, $p>0.05$). Los animales que sólo fueron infectados con *T. cruzi* (DC+I), no mostraron aumento en la expresión de CD36 en TAV.

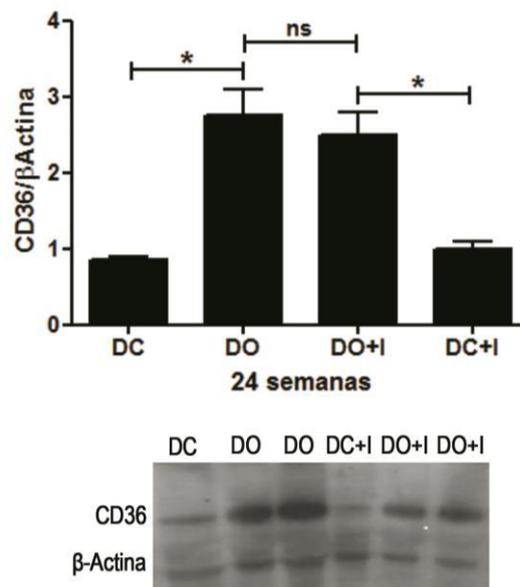


Figura 23. Expresión proteica de CD36 en tejido adiposo visceral a las 24 semanas: western blot de animales DC (control), DO (dieta obesogénica), DO+I (dieta obesogénica+infección) y DC+I (infección). La β -actina fue utilizada como control de carga. La cuantificación se realizó midiendo densidad óptica por *Image J*. Los datos son representativos de uno de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ indica diferencia significativa entre los grupos DO y DC y entre DO+I y DC+I.

El estrés oxidativo es un mecanismo clave en la patogénesis de la obesidad. Con el fin de analizar el efecto de la interrelación infección-dieta en la peroxidación lipídica del TAV, decidimos cuantificar el producto MDA a las 24 semanas (Figura 24).

El análisis estadístico aplicado (ANOVA I) demostró diferencias entre los tratamientos, $F=18.19$ $p=0.0004$. Se encontró un incremento significativo en la producción de MDA en TAV de animales DO+I comparado a DO y DC+I. Si bien los niveles de MDA son mayores en el grupo DO que en los animales controles (DC), este aumento no fue significativo estadísticamente ($p>0.05$).

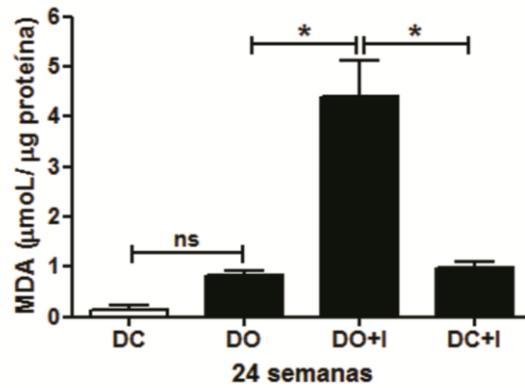


Figura 24. Efecto de la dieta y la infección con *T. cruzi* sobre el nivel de malondialdehído (MDA), expresado en μ moles de MDA por μ gramo de proteína (μ mol MDA/ μ g proteína), en tejido adiposo visceral de los animales sometidos a los tratamientos DC (control, barra blanca), DO (barra negra), DO+I (barra negra) y DC+I (barra negra). Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ muestra la comparación entre DO y DO+I y entre DO+I y DC+I. ns, $p > 0,05$ indica la relación entre DO y DC. $n = 7-10$ animales por grupo.

4.1.2.2 Efecto de la presencia del parásito y la dieta en el fenotipo de macrófagos infiltrantes y la producción intracelular de MCP1 en TAV

Teniendo en cuenta que MCP1 juega un papel fundamental en el reclutamiento de macrófagos en tejidos inflamados, decidimos estudiar la expresión de esta quimiocina en TAV de animales obesos e infectados con *T. cruzi*.

La figura 25A muestra una imagen representativa, obtenida por microscopía de fluorescencia, de la expresión de MCP1 y su principal localización en la CLS, en TAV de animales DO+I a las 12 semanas.

Con el fin de analizar el fenotipo de M Φ en TAV, se realizó por citometría de flujo la caracterización clásica de macrófagos M1 inflamatorios (F4/80+CD11c+CD206-) o M2 anti-inflamatorios (F4/80+CD11c-CD206+). En una primera instancia, se decidió cuantificar el porcentaje de leucocitos presentes en la SVF del TAV en los grupos experimentales. El ANOVA I mostró diferencias significativas en la cantidad de leucocitos entre los grupos analizados ($F=759.8$ $p<0.0001$) y se evidenció un incremento significativo del porcentaje de leucocitos infiltrantes en TAV en el grupo DO+I respecto a los grupos DO y DC+I y en el grupo DO comparado a DC (Figura 25B).

Posteriormente, analizamos el número absoluto de M Φ F4/80⁺CD11c⁺CD206⁻ (M1) y F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺ (M2) en cada grupo. La figura 25C muestra la existencia de diferencias estadísticas (ANOVA II) en el número absoluto de macrófagos M1 y M2 entre grupos: el valor del factor tratamiento fue $F=132.3$ $p<0.0001$, el factor fenotipo (M1, M2) fue $F=787.2$ $p<0.0001$ y el factor interacción fue $F=127.3$ $p<0.0001$. El test de Bonferroni demostró que el número absoluto tanto de macrófagos M1 como M2 fue significativamente

mayor en el grupo DO+I respecto a DO y DC+I y en grupo DO respecto a DC. Sin embargo, el número absoluto de macrófagos con fenotipo M2 predominó sobre los del fenotipo M1 en todos los grupos, a las 12 semanas.

Finalmente, con el fin de evaluar la población de macrófagos responsable de la producción intracelular de MCP1, cada fenotipo fue caracterizado según los marcadores de superficie $F4/80^+CD11c^+CD206^-MCP1^+$ (M1 MCP1+) o $F4/80^+CD11c^+CD206^+MCP1^+$ (M2 MCP1+) (Figura 25D). El número absoluto de macrófagos que predominó en la producción intracelular de MCP1 fueron del perfil M2. Con el empleo de ANOVA II se hallaron diferencias significativas para el factor tratamiento ($F=329.7$ $p<0.0001$), el factor fenotipo ($F=258.7$ $p<0.0001$) y el factor resultante de la interacción entre ambas variables ($F=34,31$ $p<0.0001$). Incrementos significativos en la población M2 MCP1+ y M1 MCP1+ fueron demostrados en el grupo DO+I respecto a DO y DC+I.

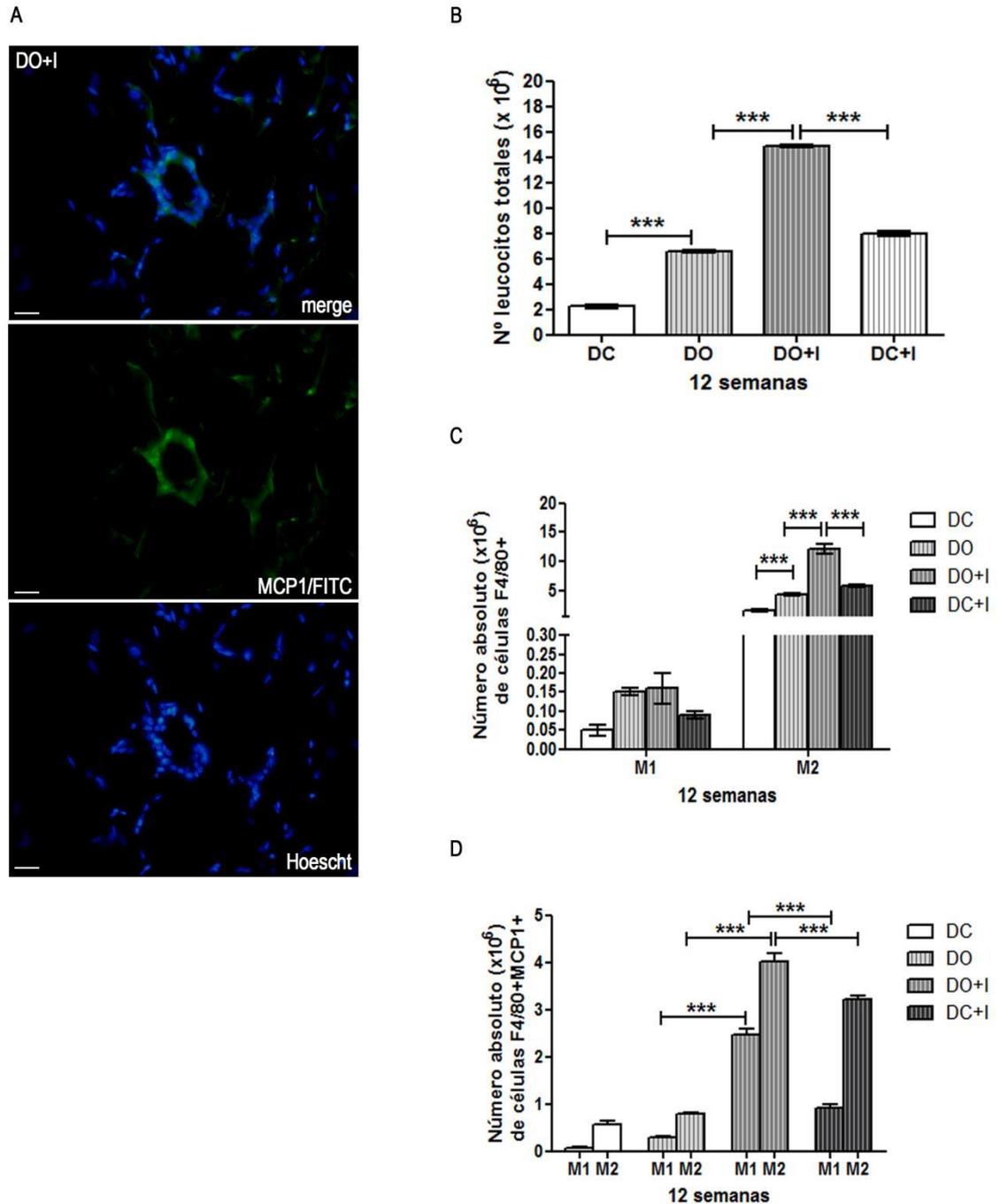


Figura 25. Producción de MCP1 y caracterización del fenotipo de macrófagos infiltrantes por citometría de flujo en tejido adiposo visceral a las 12 semanas. (A) Imagen representativa de una inmunomarcación para MCP1 en TAV de animales DO+I. Barra de calibración=50 μ m. Amplificación 400x. (B) Número absoluto de leucocitos infiltrantes. (C) Número absoluto de células F4/80+CD11c+CD206⁻ (macrófagos perfil M1) y F4/80+CD11c-DC206⁺ (macrófagos perfil M2). (D) Número absoluto de macrófagos productores de MCP1: F4/80+CD11c+CD206⁻ MCP1⁺ (M1) y F4/80+CD11c-CD206⁺ (M2). DC (control, barras blancas), DO (barras color gris claro), DO+I (barras color gris intermedio), DC+I (barra color gris oscuro). *** $p < 0.001$ por ANOVA I para comparar entre los grupos (B), *** $p < 0.001$ por ANOVA II para comparar el número de M1 y M2 (C y D).

4.1.3. Estudio de la respuesta inflamatoria sistémica en el modelo crónico de obesidad e infección con *T. cruzi*

4.1.3.1 Desbalance en la producción de citocinas y adipocinas

Dado el sinergismo existente entre la dieta y el parásito en la respuesta inflamatoria local en corazón, aorta, hígado y TAV, decidimos estudiar la respuesta inflamatoria sistémica. En la figura 26 puede observarse el panel de citocinas, MCP1 y adipocinas cuantificadas por ELISA a las 4, 12 y 24 semanas y analizadas por ANOVA II.

El análisis de los resultados para IL-6 mostró diferencias significativas entre los tratamientos, $F=8.185$ $p=0.0002$. El grupo DO presentó niveles crecientes de IL-6 desde las 4 a las 24 semanas. Sólo a las 24 semanas se apreció un incremento significativo respecto al grupo DC ($p<0.05$). En el grupo DO+I se reveló una producción exacerbada de esta citocina, con diferencias significativas respecto a DO a las 4 y 24 semanas ($p<0.01$) (Figura 26A). Los niveles de $TNF\alpha$ evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F=4.683$ $p=0.0076$), el tiempo de estudio ($F=7.175$ $p=0.0025$) y la interacción de ambas variables ($F=2.494$ $p=0.0415$). Un incremento significativo de $TNF\alpha$ se observó en el grupo DO+I respecto a DO en la etapa aguda de la infección ($p<0.001$). Esta citocina no parecería tener un papel relevante a nivel sistémico en nuestro modelo crónico de obesidad e infección (Figura 26B).

De modo similar, se encontraron cambios importantes de MCP1 a las 4 semanas. Se demostraron diferencias significativas debidas al factor tratamiento ($F=9.579$ $p=0.0004$), con incrementos significativos en el grupo DO+I comparado a DO ($p<0.001$) y DC+I ($p<0.01$). A las 12 y 24 semanas no se observaron aumentos significativos en el grupo DO+I respecto a DO (Figura 26C).

Los niveles de leptina evidenciaron diferencias significativas debidas al factor tratamiento ($F=45.12$ $p<0.0001$), tiempo ($F=20.83$ $p<0.0001$) e interacción ($F=12.72$ $p<0.0001$) (Figura 26D). En el grupo DO se hallaron niveles de leptina incrementados significativamente respecto a DC a las 4, 12 y 24 semanas ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$). El grupo DO+I mostró un aumento en relación a DC; sin embargo, sus niveles fueron significativamente menores a los del grupo DO a las 12 y 24 semanas ($p<0.001$, $p<0.05$). No se hallaron diferencias entre los grupos infectados con *T. cruzi* (DO+I y DC+I).

La adiponectina mostró diferencias entre los grupos ($F=31.62$ $p<0.0001$). Se reveló una disminución significativa en el grupo DO respecto a DC a las 4 semanas ($p<0.05$) y niveles similares fueron observados entre ambos grupos a las 12 y 24 semanas. El grupo DO+I, mostró una disminución significativa respecto al grupo DO, a las 12 y 24 semanas ($p<0.01$ y $p<0.001$, respectivamente). La presencia del parásito *per se* (DC+I) generó la

disminución de adiponectina durante la etapa aguda ($p < 0.001$) y crónica ($p < 0.01$) de la infección en relación a DC (Figura 26E).

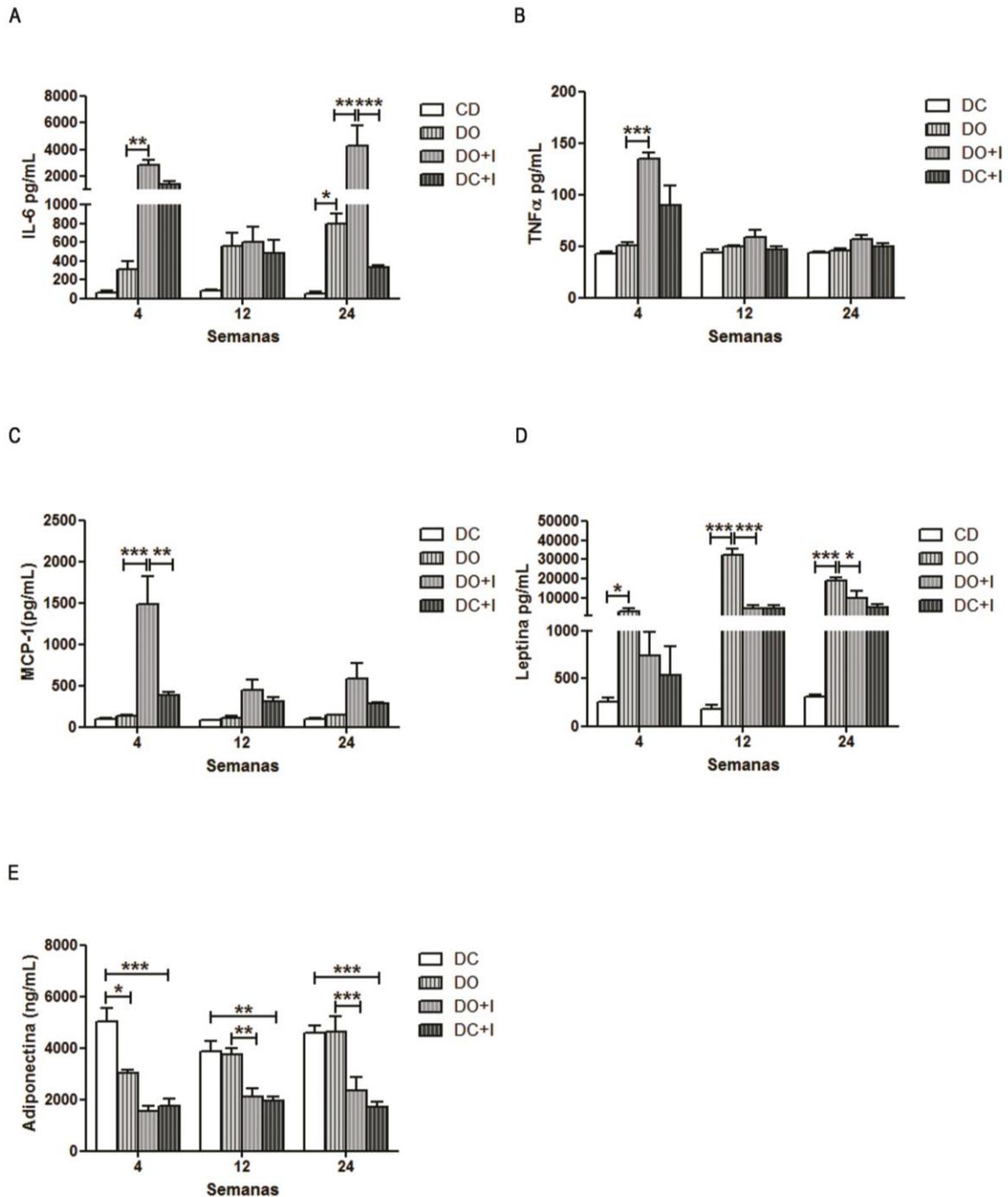


Figura 26. Influencia de la dieta y la infección sobre la respuesta inflamatoria sistémica. A las 4, 12 y 24 semanas se cuantificaron por ELISA los niveles plasmáticos de: (A) IL-6, (B) TNF α , (C) MCP1, (D) leptina y (E) adiponectina, en todos los grupos. DC (control, barras blancas), DO (grupo dieta obesogénica, barras gris claro), DO+I (grupo dieta obesogénica+infección, barras gris intermedio), DC+I (grupo infección, barras gris oscuro). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ muestran la comparación estadística entre los grupos analizados. $n = 6-9$ animales por grupo para cada tiempo.

4.1.3.2 Proteínas de fase aguda sistémicas

Las citocinas IL-6 y TNF α son capaces de estimular la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (α -1 y α -2) en condiciones inflamatorias. Teniendo en cuenta que ambas citocinas se encuentran incrementadas en el grupo DO+I en el período agudo de la infección, así como IL-6 en el grupo DO, decidimos estudiar el perfil de proteínas sistémicas a las 4 semanas (Figura 27). En la figura 27 podemos ver los perfiles obtenidos en los grupos experimentales: fracciones albúmina, α -1, α -2, β y γ (migración de izquierda a derecha). Las fracciones α -1 y α -2 representan proteínas inflamatorias de fase aguda en roedores.

En grupo DO puede observarse un aumento marcado de la fracción α -2 (macroglobulina) con respecto al grupo DC. Un incremento de las fracciones inflamatorias, α -1y α -2, fue encontrado en el grupo DO+I comparado a DO. En los grupos infectados con el parásito (DO+I y DC+I), se hallaron perfiles proteicos similares y un aumento de la fracción γ , debido a la respuesta inmune específica generada ante la infección con *T. cruzi*.

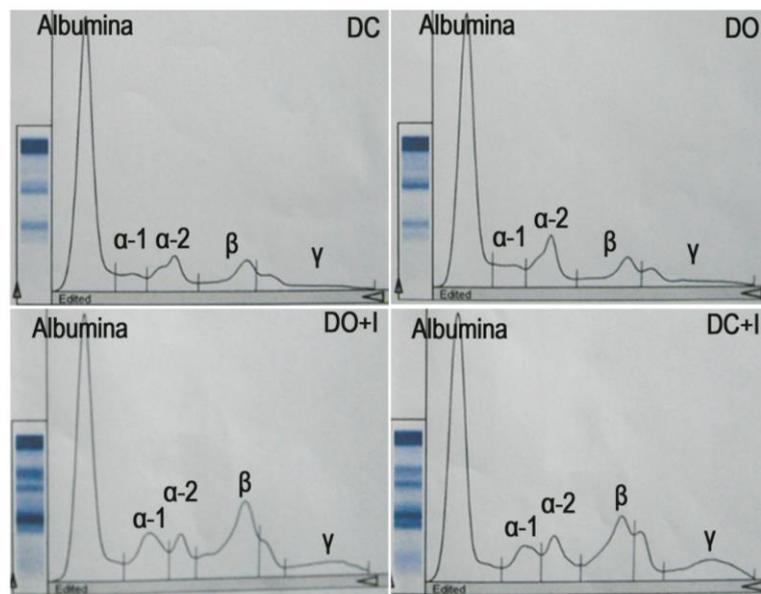


Figura 27. Perfil de proteínas plasmáticas inducido por la dieta y/o infección con *T. cruzi*. Se observa el perfil de proteínas totales por electroforesis en agarosa y su evaluación por densitometría (método automatizado) a las 4 semanas. Se muestran las bandas correspondientes a: albúmina, *alpha*-1 (α -1), *alpha*-2 (α -2), beta (β) y *gamma* (γ).

4.1.3.3 Efecto de la respuesta inflamatoria sobre la parasitemia y sobrevida de animales infectados

Posteriormente, nos preguntamos si la exacerbada respuesta inflamatoria observada, principalmente en el grupo DO+I, podría repercutir de algún modo sobre la parasitemia y sobrevida de los animales. Para ello, se realizaron curvas de parasitemia durante la etapa aguda de la infección (4 semanas) y se evaluó la sobrevida de los animales a las 4, 12 y 24 semanas. La figura 28A muestra las curvas de parasitemia de los animales DO+I y DC+I. Los animales infectados con *T. cruzi* alcanzaron, de manera similar, picos de parasitemia a los 20 días post infección. No obstante, algunos animales del grupo DO+I mostraron un segundo pico (más importante cuantitativamente que el primero) a los 35 días.

Los animales DO+I presentaron una mayor tasa de mortalidad a los 35 días comparado al grupo DC+I; mientras que en la etapa crónica, los animales del grupo DO+I alcanzaron una tasa de sobrevida similar a los del grupo DC+I (Figura 28B).

La figura 28C muestra una imagen representativa del tejido cardíaco de animales DO+I a los 35 días post infección, donde se aprecia la presencia de nidos de amastigotes y focos inflamatorios, típicos de una miocarditis aguda por *T. cruzi*.

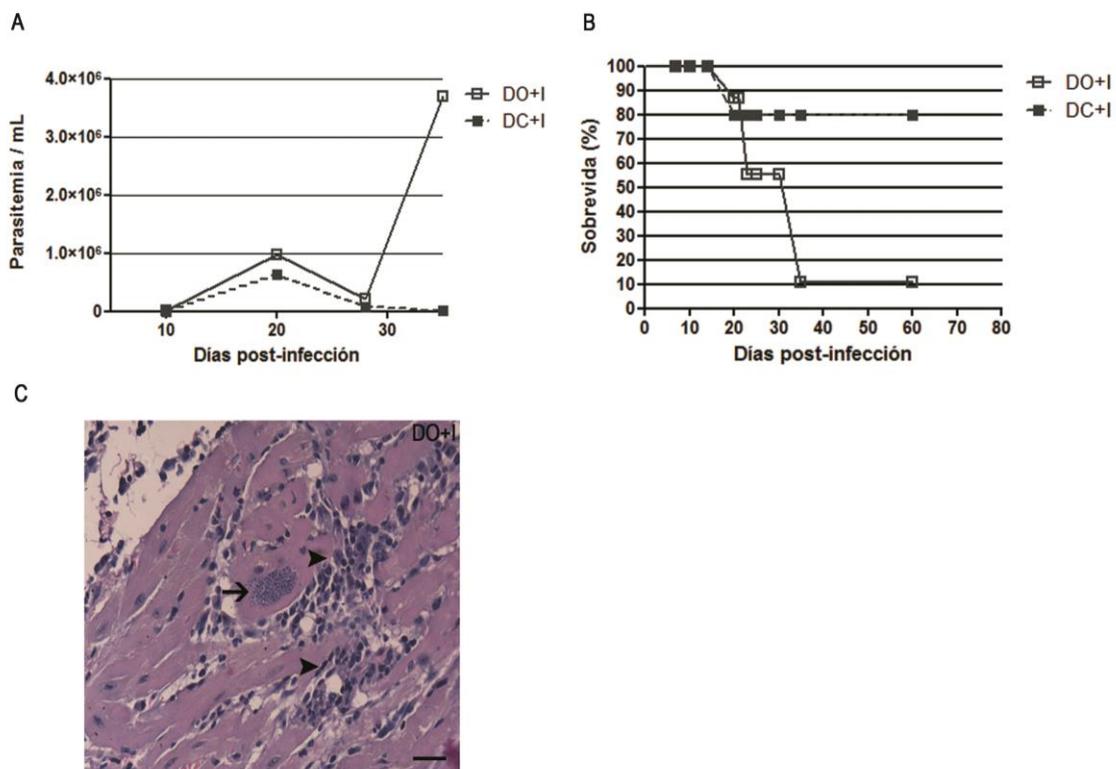


Figura 28. Curvas de parasitemia y sobrevida de animales infectados con *T. cruzi*. (A) La parasitemia fue monitoreada en animales DC+I y DO+I. (B) Estudio de la sobrevida de animales infectados durante la etapa aguda y crónica. (C) Microfotografía representativa de tejido cardíaco de animales del grupo DO+I (H&E) a los 35 días post infección. La flecha negra señala un nido de amastigotes; las cabezas de flecha indican la presencia de focos inflamatorios. Barra de calibración=40 μm. Amplificación 400x.

ESTUDIOS *IN VITRO*

4.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi* Y TRATAMIENTO CON ÁCIDOS GRASOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADIPOCITOS 3T3-L1

4.2.1 Efecto de la concentración de ácidos grasos sobre la lipotoxicidad y viabilidad celular

Los experimentos que nos permitieron abordar los siguientes resultados, fueron realizados en células adiposas maduras 3T3-L1 sometidas al proceso de diferenciación (día 9-14) y estimuladas durante 24 hs: con parásitos de la cepa Tulahuen, Ac.P (C16), Ac.E (C18), Ac.O (C18) o la combinación del parásito con un ácido graso determinado.

Primero se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán, luego de 24 hs de tratamiento, mediante el empleo de concentraciones crecientes de ácidos grasos. En la figura 29A se muestra el porcentaje de viabilidad celular de células adiposas controles (CT) y de células desafiadas con concentraciones de 50, 150 y 250 μ M de Ac.P, Ac.E, Ac.O.

Como puede observarse, la dosis de 50 μ M resultó en una viabilidad celular del 92-98% luego del tratamiento con ácidos grasos y por tanto, fue la concentración utilizada para todos los experimentos. Imágenes representativas de las células adiposas diferenciadas y teñidas con colorante ORO luego del estímulo con ácidos grasos 50 μ M, se muestran en la figura 29B. Los resultados de la figura 29C revelan la viabilidad celular luego del tratamiento por 24 y 48 hs, con ácidos grasos, con *T. cruzi* y con la combinación de ácidos grasos + *T. cruzi*; un menor porcentaje de células viables puede apreciarse a las 48 hs post tratamiento en todos los casos estudiados.

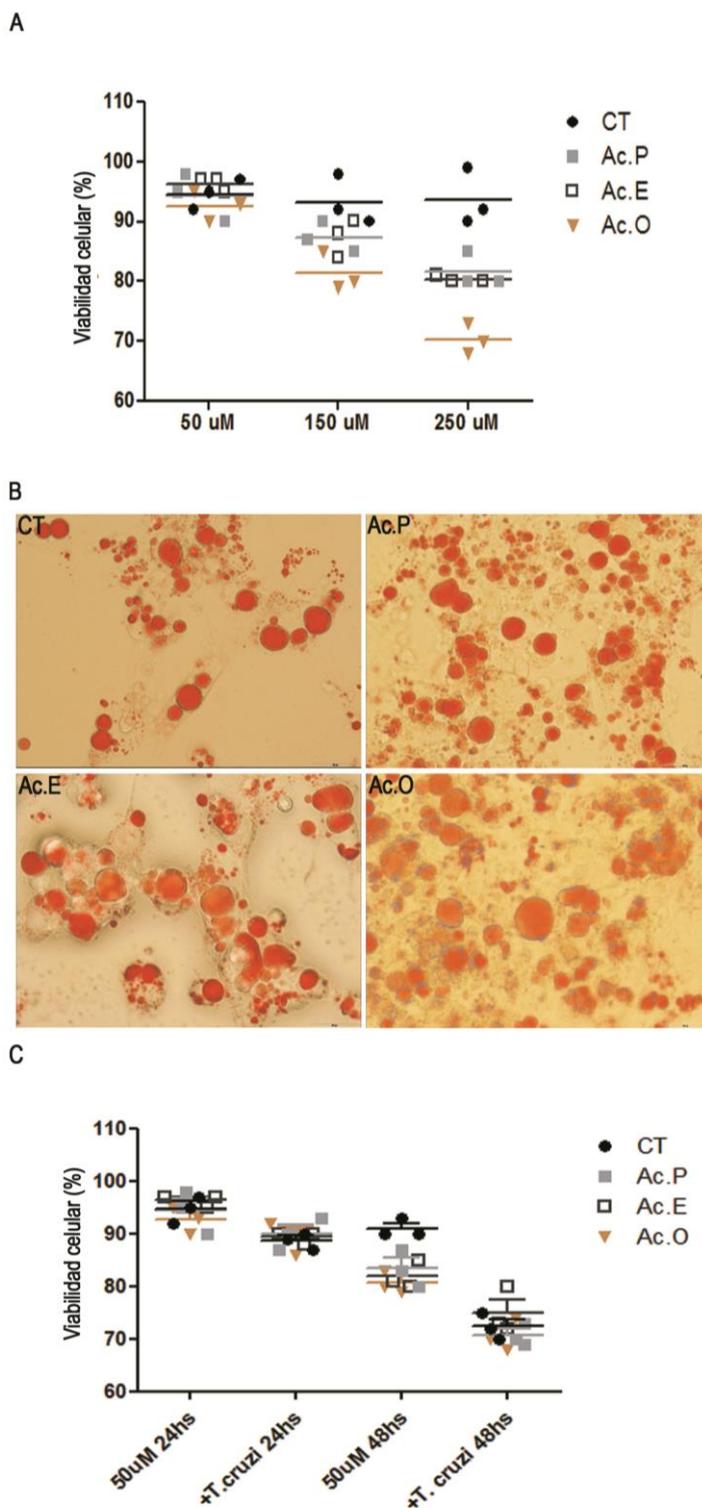


Figura 29. Análisis de viabilidad en células diferenciadas 3T3-L1. (A) Luego del estímulo con ácido palmítico (Ac.P), ácido esteárico (Ac.E) y ácido oleico (Ac.O) en concentraciones crecientes de 50, 150 y 250 μ M, comparado con las células sin estimular (control, CT), por 24 hs. (B) Microfotografías representativas de células adiposas, coloreadas con Oil-red-O (ORO), sin estimular y luego del estímulo por 24 hs con 50 μ M de cada ácido graso. Barra de calibración=50 μ m. Amplificación 400X. (C) Viabilidad celular después del estímulo con ácidos grasos (Ac.P, Ac.E, Ac.O) y del estímulo combinado de ácidos grasos y *T. cruzi* (Ac.P+*T. cruzi*, Ac.E+*T. cruzi*, Ac.O+*T. cruzi*) a las 24 y 48 hs. Células sin estimular (CT) y el estímulo del parásito *per se* también fueron evaluados (CT+*T. cruzi*).

4.2.2 Estudio de la influencia del *T. cruzi* y ácidos grasos sobre la expresión basal y post estímulo del receptor CD36

La figura 30 muestra los resultados obtenidos al evaluar la expresión del receptor *scavenger* CD36 por western blot, a las 24 hs de tratamiento con ácidos grasos y con *T. cruzi*. Se observó la ausencia de este receptor en las células adiposas controles (CT). El estímulo con Ac.P y Ac.E no fue capaz de inducir la expresión de CD36, mientras que el tratamiento con Ac.O, resultó en un ligero incremento de su expresión a las 24 hs. Notablemente, la presencia del parásito produjo un aumento en la expresión proteica de CD36, dependiente de la cantidad de parásitos utilizada: a mayor carga parasitaria, mayor expresión del receptor (1:1 vs. 2:1, célula: parásito). El parásito *per se* fue un contribuyente clave en la inducción de este receptor en las células adiposas (CT+*T. cruzi* vs. CT), mostrando diferencias significativas en las células que fueron expuestas a *T. cruzi*, $F=492.9$ $p<0.0001$. El tratamiento con ácidos grasos y la interacción entre ambas variables mostraron diferencias estadísticas ($F=34.04$ $p<0.0001$, $F=19.19$ $p<0.0001$).

El test de Bonferroni demostró que las células expuestas al parásito (CT+ *T. cruzi*) en una relación 1:1 y las células adiposas sometidas conjuntamente al parásito y Ac.P (Ac.P+ *T.cruzi*), Ac.E (Ac.E+ *T.cruzi*) o Ac.O (Ac.O+ *T.cruzi*), indujeron la expresión significativa de CD36 ($p<0.001$).

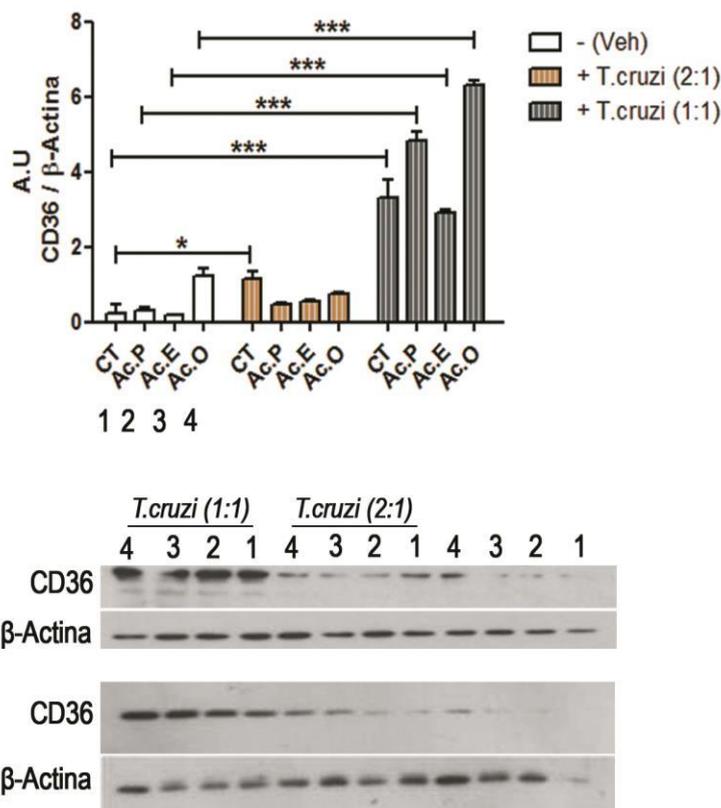


Figura 30. Expresión del receptor CD36 en células adiposas 3T3-L1. CD36 se evaluó por western blot en lisado de células adiposas diferenciadas y estimuladas por 24 hs con ácidos grasos y *T. cruzi* en una relación 2:1 y 1:1 (célula: parásito). Se utilizó β -actina como control de carga. 1 = control (CT), 2 = ácido palmítico (Ac.P), 3 = ácido esteárico (Ac.E), 4 = ácido oleico (Ac.O). El grupo de células tratadas con *T. cruzi* más ácidos grasos fueron comparadas con el grupo de células tratadas con cada ácido graso, respectivamente, mediante ANOVA II. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$. Este experimento es representativo de tres experimentos independientes con $n=2$ por grupo.

4.2.3 Estudio de la influencia del *T. cruzi* y ácidos grasos sobre la respuesta inflamatoria de la célula adiposa

4.2.3.1 Producción de citocinas pro-inflamatorias

El panel de citocinas pro-inflamatorias evaluadas en los sobrenadantes celulares fue el mismo que el analizado en el modelo *in vivo* por ELISA, a las 24 y 48 hs post tratamiento (Figura 31). Los resultados por ANOVA II mostraron diferencias significativas en los niveles de IL-6 atribuidas al tiempo de tratamiento con parásitos (24 o 48 hs), $F=165.1$ $p < 0.0001$ y al tratamiento con ácidos grasos (Ac.P, Ac.E, Ac.O), $F=3.968$ $p=0.0178$. Valores similares fueron hallados en los niveles de IL-6 entre las células controles (CT) y las estimuladas con los ácidos grasos a las 24 hs.

No se hallaron diferencias significativas entre las células que fueron sometidas al estímulo con *T. cruzi* durante 24 hs (CT+ *T. cruzi*, Ac.P+ *T. cruzi*, Ac.E+ *T. cruzi*, Ac.O+ *T. cruzi*) y las células que recibieron sólo el tratamiento con ácidos. Sin embargo, el análisis reveló un aumento significativo de IL-6 en las células desafiadas con ambos estímulos durante 48 hs respecto a las 24 hs ($p < 0.001$) (Figura 31A).

El comportamiento de $\text{TNF}\alpha$ resultó diferente, observándose diferencias significativas debidas al tratamiento con parásitos (24 o 48hs), $F = 46.42$ $p < 0.0001$ y a la interacción parásito/ácido graso ($F = 3.670$ $p = 0.009$). Sin embargo, no se hallaron diferencias debidas al tratamiento con los ácidos grasos ($F = 0.2713$ $p = 0.2713$). Cuando las células fueron estimuladas con Ac.P, Ac.E y Ac.O, se encontró un ligero incremento no significativo de esta citocina por las células adiposas, en relación a células controles. Contrariamente, la presencia adicional del parásito en cada grupo de células estimuladas con ácidos grasos, indujo una disminución significativa en la producción de $\text{TNF}\alpha$ a las 24 hs de tratamiento respecto a las células tratadas sólo con los correspondientes ácidos grasos. A las 48 hs, un incremento significativo fue observado en las células controles tratadas con *T. cruzi* (CT+ *T. cruzi*) y en las tratadas con Ac.E o Ac.O y el parásito (Ac.E+ *T. cruzi*, Ac.O+ *T. cruzi*), respecto a los niveles encontrados a las 24 hs para cada condición. El parásito *per se* fue capaz de inducir una secreción significativa de esta citocina sólo a las 48 hs de la infección (Figura 31B).

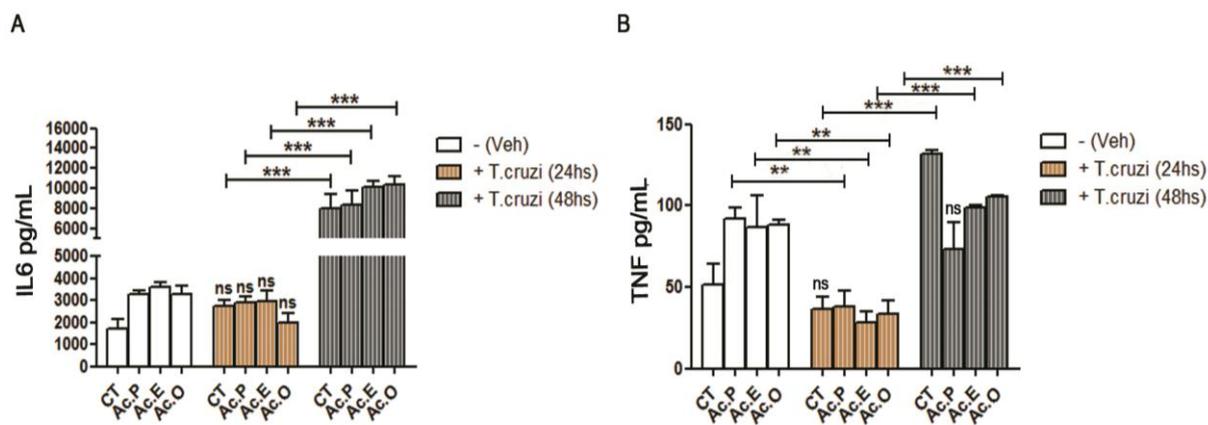


Figura 31. Influencia del tratamiento con ácidos grasos y *T. cruzi* sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias a las 24 y 48 hs: (A) IL-6 y (B) TNF α . Se analizaron células tratadas con ácidos grasos por 24 hs (Ac.P, Ac.E, Ac.O, barras en blanco) respecto a células tratadas con ácidos grasos + *T. cruzi* por 24 hs (barras en rosa) y estas, respecto a células tratadas con ácidos grasos + *T. cruzi* por 48 hs (barras en gris). Como control para cada grupo: células sin estimular (CT, barra en blanco), células tratadas con *T. cruzi* por 24 hs (barra en rosa) y células tratadas con *T. cruzi* por 48 hs (barra en gris). ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. $n = 5-6$ por condición analizada.

4.2.3.2 Expresión del factor de transcripción anti-inflamatorio PPAR γ

Observando que existe una especie de regulación de la respuesta inflamatoria en las células adiposas a las 24 hs de la infección con *T. cruzi* y el tratamiento con ácidos grasos, evaluamos la expresión del factor de transcripción PPAR γ mediante western blot.

ANOVA II demostró diferencias significativas para el factor tratamiento con *T. cruzi* $F=70.95$ $p<0.0001$ y para el factor tratamiento con ácidos grasos $F=5.271$ $p=0,0150$. La interacción entre ambos factores fue de $F=6.556$ $p=0.0029$.

Los resultados demostraron la expresión de PPAR γ en células 3T3-L1 en condiciones basales (CT). El test de Bonferroni demostró que tanto el estímulo con ácidos grasos y el estímulo conjunto de *T. cruzi* / ácido graso por 48 hs (CT+ *T.cruzi*, Ac.P+ *T.cruzi*, Ac.E+ *T.cruzi*, Ac.O+ *T.cruzi*), generaron una expresión similar de PPAR γ en todas las células adiposas tratadas (Figura 32). Sólo el tratamiento por 24 hs con *T. cruzi* / ácido graso reveló un aumento significativo de la expresión de PPAR γ respecto a las restantes condiciones. Este hallazgo podría vincularse a la disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias por estas células bajo las mismas condiciones de tratamiento (Figura 32A, B).

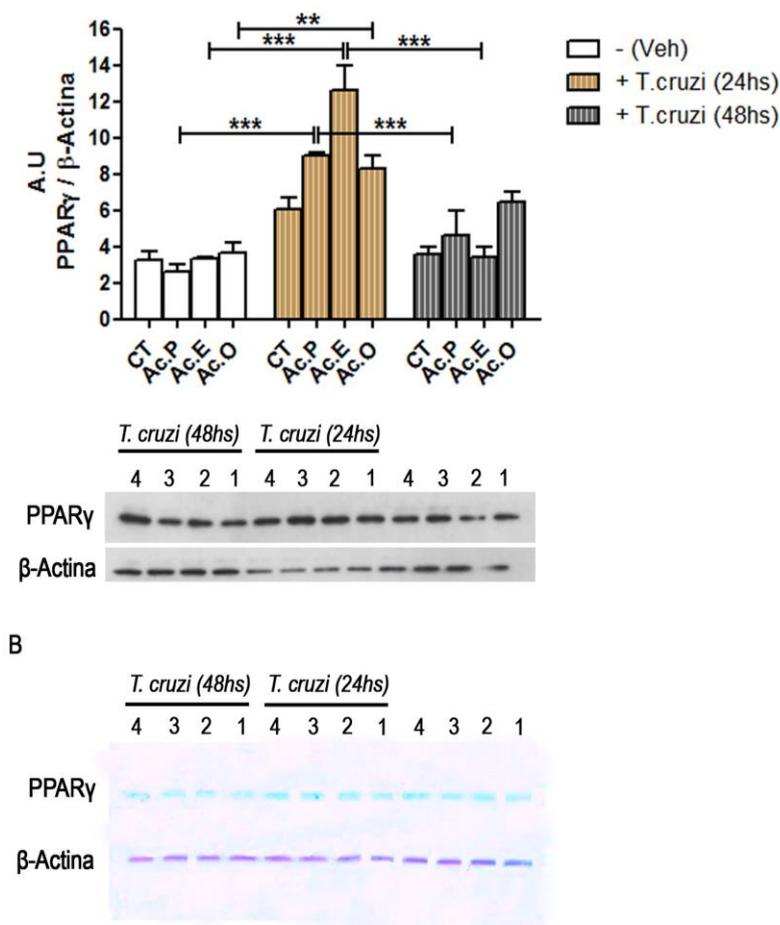


Figura 32. Expresión del factor de transcripción PPAR γ en células adiposas 3T3- L1. Análisis por western blot en células adiposas estimuladas con ácidos grasos y con *T. cruzi* por 24 y 48 horas con (A) quimioluminiscencia y (B) sistema *Odyssey*. Se utilizó β -actina como control de carga. 1 = control (CT), 2 = ácido palmítico (Ac.P), 3 = ácido esteárico (Ac.E), 4 = ácido oleico (Ac.O). El grupo de células tratadas con *T. cruzi* (24 horas) más ácidos grasos fueron comparadas con el grupo de células tratadas con cada ácido graso (24 horas) y con el grupo de células tratadas con *T. cruzi* más ácidos grasos por 48 horas. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ por ANOVA II. Representativo de uno de tres experimentos independientes.

4.2.4 Efecto de la infección con *T. cruzi* y ácidos grasos en la modulación de corpúsculos lipídicos en la célula adiposa

4.2.4.1 Estudio de corpúsculos lipídicos

Los corpúsculos lipídicos de la célula adiposa son diferentes a los que se encuentran en otros tipos celulares debido a su tamaño, a su distintiva composición proteica y a la capacidad de someterse a cambios dinámicos de acuerdo al microambiente al que la célula esté expuesta. Para estudiar la repercusión de la presencia del *T. cruzi* y los ácidos grasos sobre la estructura de los corpúsculos lipídicos, evaluamos mediante tinción con Bodipy células controles, tratadas con *T. cruzi* y *T. cruzi* + ácidos grasos, a las 24 hs.

La figura 33 muestra imágenes representativas de los corpúsculos lipídicos en células adiposas diferenciadas en las siguientes condiciones: sin estimular (CT), estimuladas con *T. cruzi* (CT+*T. cruzi*), estimuladas con cada ácido graso ensayado (Ac.P, Ac.E, Ac.O) y estimuladas con la combinación de *T. cruzi* y ácidos grasos (Ac.P+ *T. cruzi*, Ac.E+ *T. cruzi*, Ac.O+ *T. cruzi*).

Como puede observarse, la presencia de ácidos grasos indujo un aumento en el tamaño de los corpúsculos lipídicos respecto a células controles. Contrariamente, todos los

grupos de células que fueron tratadas con el parásito, mostraron una disminución en el tamaño de estas organelas.

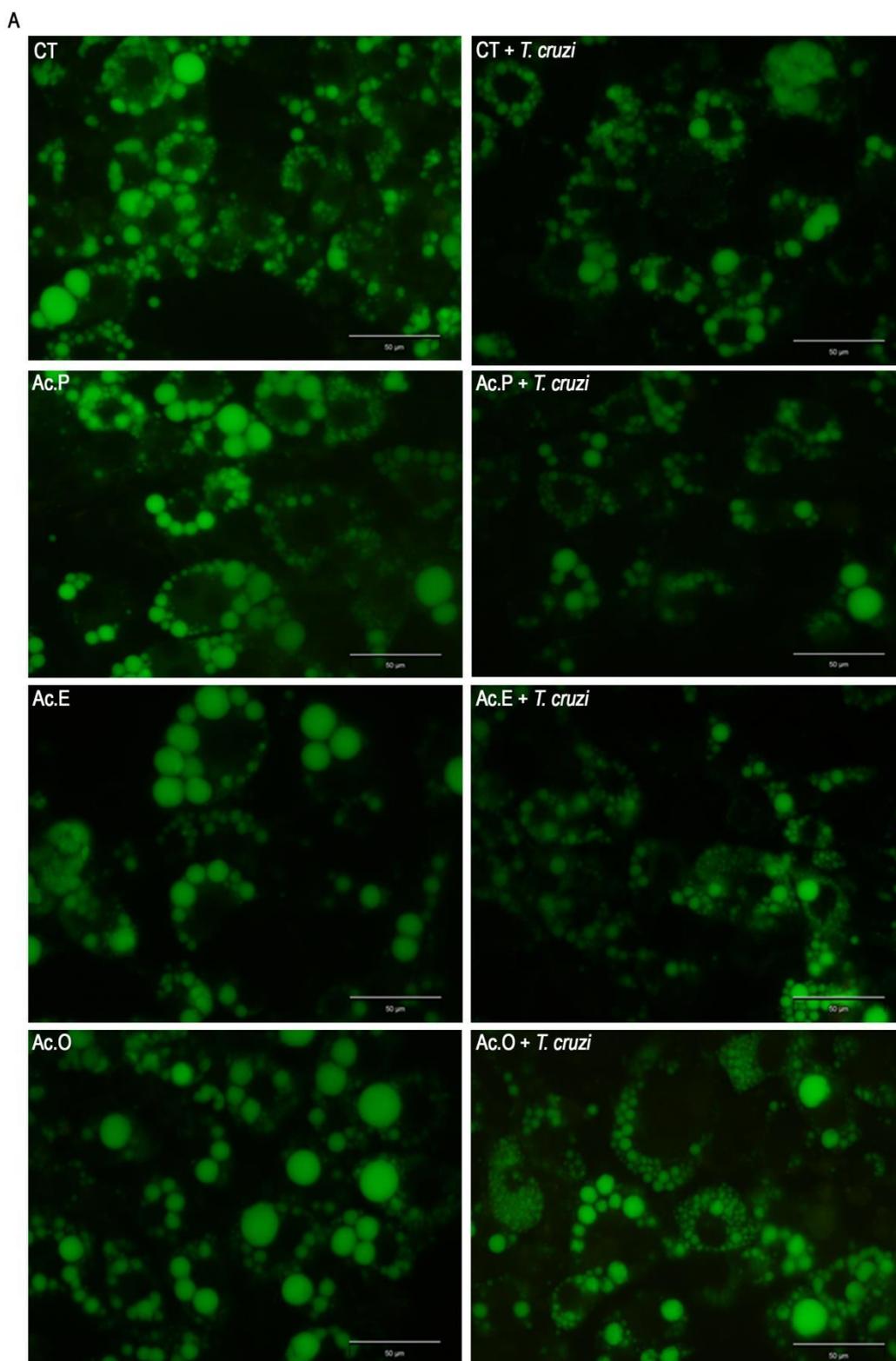


Figura 33. Tinción de corpúsculos lipídicos con Bodipy (verde). Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia son representativas de células tratadas con ácidos grasos (Ac.P, Ac.E, Ac.O) y ácidos grasos más *T. cruzi* (Ac.P+*T. cruzi*, Ac.E+*T. cruzi*, Ac.O+*T. cruzi*) por 24 hs. Células sin estimular (controles, CT) y estimuladas sólo con *T. cruzi* (CT+*T. cruzi*), también fueron analizadas. Barra de calibración=50µm. Amplificación=600x.

Posteriormente, cuantificamos la extracción de lípidos neutros en las diferentes condiciones experimentales. Los resultados mostraron la reducción en la densidad óptica y por ende de la cantidad de lípidos neutros extraídos, en las células estimuladas con *T. cruzi*. Los diferentes tratamientos con ácidos grasos (saturados e insaturado) no demostraron diferencias estadísticas por ANOVA II ($F = 0.9897$ $P = 0.4287$). Sin embargo, sí se hallaron diferencias estadísticas entre las células que fueron tratadas con el parásito y las no expuestas a este agente infeccioso, $F = 32.66$ $P < 0.0001$ (Figura 34).

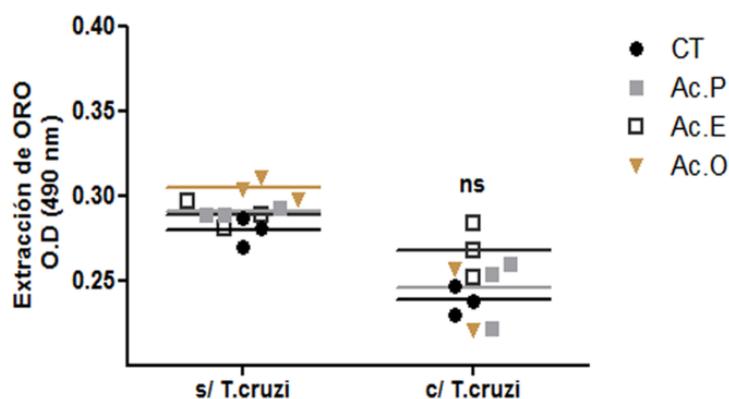


Figura 34. Cuantificación de lípidos neutros por extracción de Oil-red-O. Se obtuvieron las densidades ópticas (O.D) a 490 nm de células controles (CT) y estimuladas durante 24 hs con ácidos grasos (Ac.P, Ac.E, Ac.O), con *T. cruzi* (CT c/*T.cruzi*) y ácidos grasos + *T. cruzi* (Ac.P c/*T.cruzi*, Ac.E c/*T.cruzi*, Ac.O c/*T.cruzi*). Este experimento es representativo de tres experimentos independientes con $n=3$ por grupo. ns, no significativo por ANOVA II ($p > 0.05$).

En la figura 35 observamos imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células diferenciadas y tratadas con Ac.P, Ac.E, Ac.O y *T. cruzi*, marcadas con Bodipy y DAPI, para localizar núcleos celulares y parásitos infectantes. Puede observarse la presencia de amastigotes de *T. cruzi* alrededor de corpúsculos lipídicos con un aparente proceso de lipólisis.

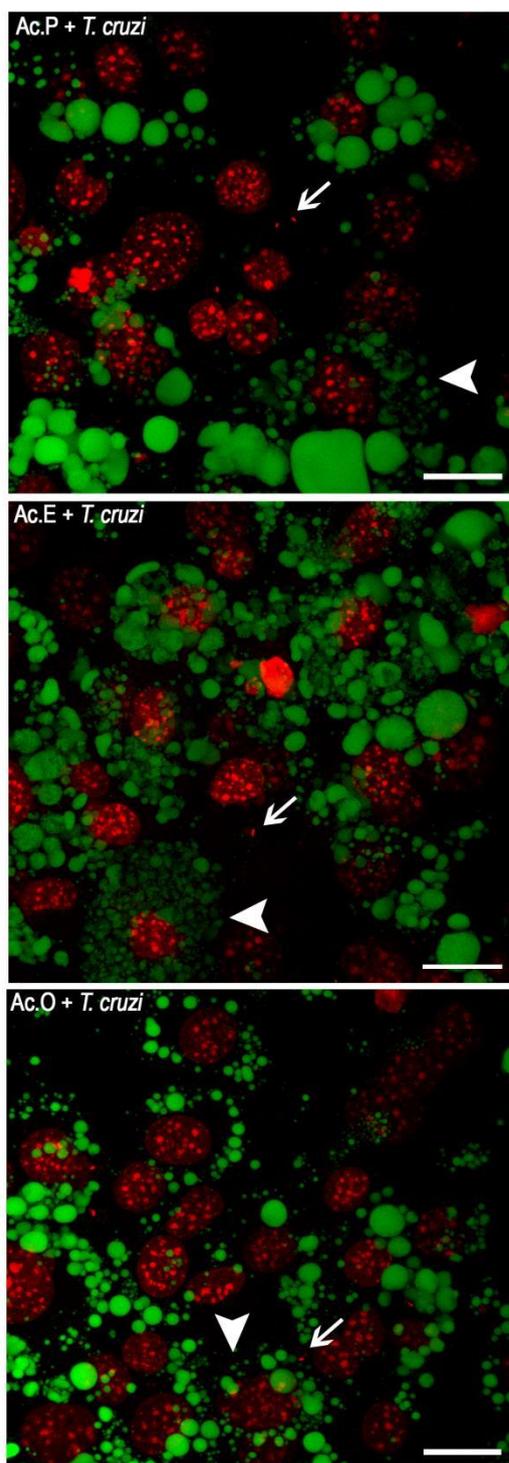


Figura 35. Influencia de la presencia de *T. cruzi* sobre los corpúsculos lipídicos en células adiposas. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de adipocitos diferenciados y tratados con Ac.P+*T. cruzi*, Ac.E+*T. cruzi* y Ac.O+*T. cruzi*. Las células fueron marcadas con Bodipy (verde) para la observación de corpúsculos lipídicos y DAPI (en rojo) para la visualización de núcleos celulares y amastigotes de *T. cruzi*. Barra de calibración=50 μ m. Aumento 600x.

4.2.4.2 Expresión de ADRP en células adiposas

Análisis proteómicos han demostrado la presencia de ADRP en adipocitos estimulados lipolíticamente, no así en condiciones basales, sugiriendo el compromiso de ADRP en el proceso lipolítico de estas células. Esto nos condujo al estudio de su expresión proteica en estas células (Figura 36).

El análisis por western blot demostró una baja expresión de ADRP en condiciones basales (CT). Sin embargo, el estímulo con los ácidos grasos mostró un importante aumento de ADRP en la célula adiposa. La presencia del *T. cruzi* no resultó en un incremento exacerbado respecto al dado por los ácidos grasos *per se*. No obstante, se demostró que la sola presencia del parásito (CT+ *T. cruzi*) fue capaz de inducir una fuerte expresión de ADRP. Mediante ANOVA II, el factor tratamiento con ácidos grasos no permitió comprobar diferencias significativas entre los valores cuantificados por densidad óptica (ADRP/ β -Actina), $F=2.692$ $p=0.1168$. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre los grupos (CT, Ac.P, Ac.E, Ac.O) debidos al factor tratamiento con *T. cruzi*, $F=17.14$ $p=0.0033$. El test de Bonferroni, sin embargo, no reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales comparados entre sí: CT vs. CT+*T. cruzi*; Ac.P vs. Ac.P+*T. cruzi*; Ac.E vs. Ac.E+*T. cruzi*; Ac.O vs. Ac.O+*T. cruzi*.

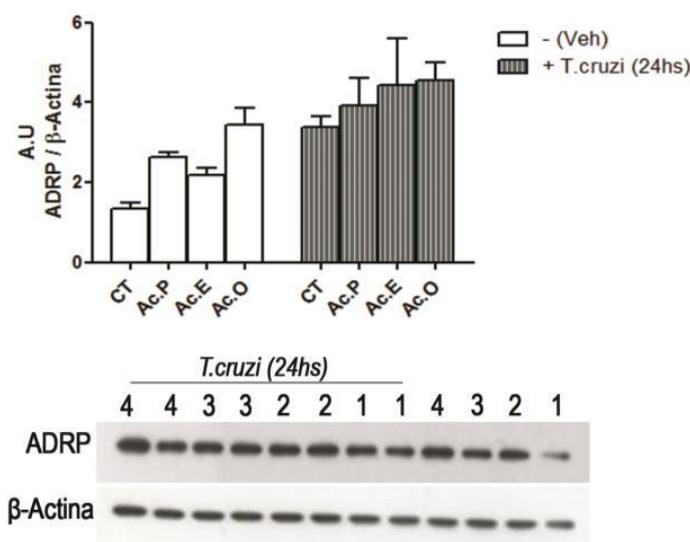


Figura 36. Expresión de ADRP en células adiposas 3T3-L1. Análisis por western blot de células adiposas estimuladas con ácidos grasos y *T. cruzi* por 24 hs. Se utilizó β -actina como control de carga. 1 = control (CT), 2 = ácido palmítico (Ac.P), 3 = ácido esteárico (Ac.E), 4 = ácido oleico (Ac.O). El grupo de células tratadas con *T. cruzi* más ácidos grasos fueron comparadas con el grupo de células tratadas con cada ácido graso (24 hs). Resultado representativo de uno de tres experimentos independientes.

4.2.4.3 Estudios preliminares sobre la expresión de ADRP y PPAR γ en preadipocitos 3T3-L1

Para evaluar si las células pre-adiposas 3T3-L1 expresaban constitutivamente ADRP en sus corpúsculos lipídicos, como sucede con otros tipos celulares tales como macrófagos, decidimos realizar mediante western blot el análisis de ADRP en preadipocitos, a las 48 hs. Asimismo, analizamos la expresión de PPAR γ como factor de transcripción involucrado en la adipogénesis y diferenciación de preadipocitos a células adiposas (Figura 37).

La figura 37 demostró que los corpúsculos lipídicos de preadipocitos carecen de ADRP en condiciones basales (CT). El estímulo con *T. cruzi* (1:1) reveló una inducción de ADRP en estas células luego de 24 hs. Por otra parte, la adición de Ac.P, no fue capaz de inducir su expresión; mientras que, la presencia conjunta de *T. cruzi* + Ac.P generó un aumento de ADRP en preadipocitos. Del mismo modo, el estímulo con Ac.E demostró una ligera inducción de ADRP y la combinación de *T. cruzi* + Ac.E resultó en un incremento marcado de esta proteína. El Ac.O indujo el mayor aumento en la expresión proteica de ADRP en corpúsculos lipídicos de células pre-adiposas a las 24 hs. La presencia concomitante de *T. cruzi* + Ac.O, también reveló una importante inducción en la expresión de dicha proteína.

Los resultados mostraron que los preadipocitos carecen de expresión constitutiva de PPAR γ en condiciones basales (CT) y que el estímulo con Ac.P, Ac.E o Ac.O no fue capaz de inducirla. Sin embargo, el estímulo con *T. cruzi* demostró la inducción de PPAR γ en estas células y la presencia conjunta de *T. cruzi* + ácidos grasos también resultó en el aumento de esta expresión.

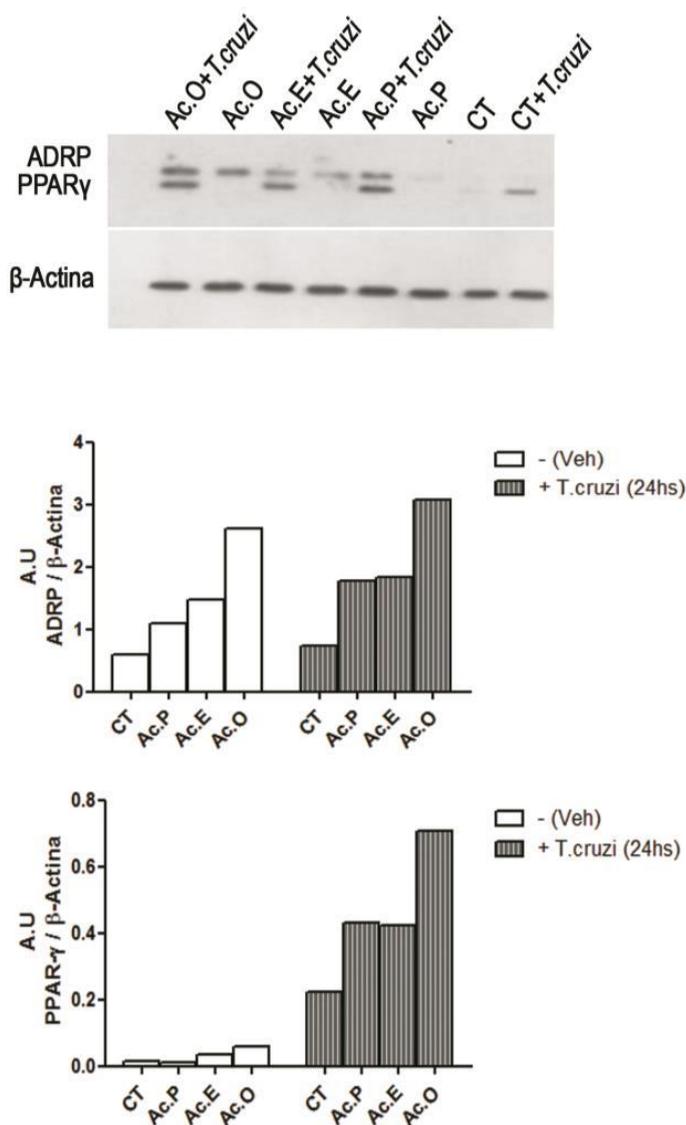


Figura 37. Análisis de la expresión de ADRP y PPAR γ en preadipocitos 3T3-L1 por western blot, luego del estímulo con ácidos grasos (barras blancas) y ácidos grasos más *T. cruzi* (barras grises) por 24 hs. Se utilizó β -actina como control de carga. Los gráficos son el resultado de un único experimento, por lo que se muestran sólo las medias y es considerado un resultado preliminar. CT, control; Ac.P, ácido palmítico; Ac.E, ácido esteárico; Ac.O, ácido oleico; veh, vehículo.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La prevalencia de la obesidad continúa creciendo de manera abrupta a nivel mundial. Esto hace imperativo la necesidad de desarrollar modelos animales que compartan características con la obesidad y sus co-morbilidades en humanos [158] y que conformen, a su vez, plataformas de utilidad para el estudio de los mecanismos patogénicos involucrados en su génesis, como así también, para la implementación de potenciales tratamientos terapéuticos tendientes a minimizar y/o contrarrestar sus consecuencias.

En este sentido, el conjunto de alteraciones metabólicas que acompaña a la obesidad ha sido extensamente estudiado a través del uso de modelos clásicos de obesidad inducidos por dietas con alto contenido graso (HFD), las que varían entre un 40-65%, o mediante modelos animales modificados genéticamente [151]. Respecto a estos últimos, los más utilizados son los ratones deficientes en leptina *ob/ob*, ratones deficientes en el receptor de leptina *db/db* y las ratas Zucker con mutaciones en el receptor de leptina.

Debido al hecho de que la exposición sostenida de fructosa conlleva al desarrollo de desórdenes metabólicos tales como hipertrigliceridemia, esteatosis hepática y acumulación de TAV, los modelos animales sometidos a la administración de una ingesta elevada de fructosa diaria, entre un 15 a un 30%, han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, si la fructosa consumida en una cantidad baja o moderada tiene efectos deletéreos sobre estos procesos, aún no ha sido demostrado [171, 172]. Existe evidencia que avala la capacidad de la STZ, administrada en dosis altas, para inducir modelos animales de DM1, en ratas o ratones inyectados por vía intraperitoneal [66, 172] y de demencia, cuando son inyectados vía intracerebroventricular [173].

En nuestro trabajo, demostramos que la alimentación con una dieta moderada en grasas y concentraciones bajas de fructosa en el agua de bebida, combinados con una dosis mínima de STZ, resultan en el desarrollo de un modelo experimental de obesidad inducido por dieta. En este modelo, mostramos la inducción de IR (Figura 13) y progresión a DM2, dislipemia (Figura 14), hiperleptinemia y resistencia a la acción de leptina (Figura 26), alteraciones cardiovasculares (Figura 15) y esteatosis hepática simple (Figura 18). Esta constelación de desordenes metabólicos son compatibles con las características bioquímico-clínicas de un síndrome metabólico. En nuestro modelo, la dosis empleada de STZ tuvo por objeto generar una destrucción selectiva y parcial de las células β pancreáticas y de este modo, favorecer la progresión hacia DM2.

En este marco, consideramos que este modelo proporcionaría una plataforma de utilidad para describir las formas no extremas de obesidad y progresión a diabetes, así como también, las anormalidades metabólicas que dominan el campo clínico en la actualidad.

Nuestro modelo crónico de obesidad mostró un aumento de los parámetros morfométricos evaluados: peso corporal, diámetro de cintura e IMC (Figura 10). Como

podemos observar, el tratamiento obesogénico indujo cambios significativos respecto al tratamiento control a las 12 y 24 semanas. Cabe destacar, que dichos incrementos fueron atribuidos principalmente a la composición de la dieta grasa administrada ya que no observamos diferencias apreciables entre las cantidades consumidas por los animales (dieta estandar vs. dieta grasa) a las 12 y 24 semanas. El incremento del diámetro de cintura demostrado en el grupo DO, con predominio de adiposidad visceral y desarrollo de obesidad central (Figura 10), es compatible a lo que ocurre en humanos. Esto podría vincularse con la mayor prevalencia de los pacientes con obesidad androide de padecer riesgo metabólico y cardiovascular [39]. Esto se reflejó en un aumento significativo del contenido del TAV a las 12 y 24 semanas en los animales DO, comparado al grupo control (DC).

La patogénesis de la enfermedad de Chagas ha sido ampliamente asociada a la desregulación metabólica. Al respecto, modelos murinos de diabetes inducidos con drogas (STZ) y/o genéticos (*db/db*), mostraron una mayor parasitemia y mortalidad luego de la infección con *T. cruzi*, sugiriendo que la desregulación metabólica sería beneficiosa para la invasión del parásito en el huésped [137].

Nuestros resultados demostraron que la presencia del *T. cruzi*, en un contexto nutricional compatible con el desarrollo de obesidad e IR, produjo una mejora de los parámetros morfométricos en la etapa aguda y crónica. Esto significa que el peso corporal, el diámetro de cintura, la cantidad de TAV y el IMC presentaron valores significativamente menores, respecto al grupo DO, a pesar de estar sometidos al mismo contexto nutricional (Figura 10). Estos resultados podrían relacionarse al hecho de suponer que el parásito utilizaría el exceso de nutrientes del huésped para favorecer su propia proliferación y supervivencia [137]. En concordancia con nuestras observaciones, Nagajyothi y col. (2012) demostraron que la infección con *T. cruzi* (5×10^4 tripomastigotes) en ratones CD-1 resultó en la disminución del contenido graso corporal, atribuible al aumento de lipasas del TA de los animales infectados [147].

La participación del receptor TLR4 en la patogénesis de diferentes desordenes metabólicos, ha sido ampliamente documentada [21, 33]. Por su parte, el compromiso de los TLR en la infección con *T. cruzi*, principalmente TLR2, también ha sido ampliamente evidenciado; de hecho, animales deficientes en estos receptores presentan una mayor parasitemia y mortalidad [146].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, nuestro modelo de obesidad e infección fue desarrollado en animales deficientes para TLR4 (TLR4^{-/-}) con la finalidad de comprobar la importancia dada por la señalización de este receptor en nuestras condiciones experimentales.

Los resultados mostraron que la ausencia de TLR4 protegió a los animales sometidos a la dieta obesogénica (DO^{-/-}) del incremento de peso corporal a las 4 y 12

semanas respecto a los grupos DC^{-/-} y DO+I^{-/-}. De manera interesante, observamos que la señalización dada por TLR4 participa en la inducción de obesidad visceral en los animales WT (Figuras 12 vs. 10).

Llamativamente, los grupos DO^{-/-} y DO+I^{-/-} mostraron un aumento del contenido de TAV a las 12 y 24 semanas, a diferencia de lo observado en los animales salvajes (*wild type*, WT), en los cuales dicho aumento sólo pudo ser evidenciado en ratones DO. Es interesante destacar que dos factores podrían contribuir a este fenómeno: por un lado, la administración continua de fructosa, ya que este azúcar aumenta el depósito de grasa central y por el otro, la ausencia de la respuesta inflamatoria mediada por TLR4, que podría resultar en una tasa disminuida de lipólisis tisular y un consecuente aumento de TAV. Debido a que la fructosa es administrada en ambos modelos WT y TLR4^{-/-}, hipotetizamos que sería principalmente la ausencia de TLR4, la que estaría marcando esta diferencia.

Es ampliamente conocido que un flujo de fructosa alto es capaz de producir disturbios en el metabolismo hepático de glucosa y contribuir al aumento de la síntesis *de novo* de triglicéridos, llevando a insulino resistencia hepática y al desarrollo de NAFLD, en humanos y animales [28, 29]. Enfatizamos que en nuestro modelo, la administración de una concentración baja de fructosa, fue capaz de inducir IR -evidenciada por el incremento del índice HOMA-IR- a partir de las 12 semanas de tratamiento (Figura 13C). En relación, observamos una homeostasis de glucosa alterada a nivel sistémico, caracterizada por hiperglucemia a partir de las 4 semanas, en comparación a los animales controles (DC). A nivel hepático, reportamos un aumento significativo en el contenido lipídico a las 12 semanas, compatible con el desarrollo de esteatosis hepática en estos animales, en concordancia con la IR demostrada a ese tiempo (Figura 18). En este contexto cabe mencionar, que la insulino resistencia ha sido propuesta como uno de los principales mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de NAFLD, con el aporte de evidencias a nivel humano y experimental [25, 26].

Por otro lado, se pudo observar que la presencia concomitante del parásito y de un *estatus* nutricional obesogénico, resultó en hiperinsulinemia compensatoria e insulino resistencia periférica agudas capaces de regular la homeostasis de la glucosa, manteniendo normales sus niveles a las 4 semanas; mientras que, durante la etapa crónica de la infección, se pudo evidenciar una producción de insulina menor, que resultó insuficiente para regular los niveles de glucemia (Figura 13). Esto reflejaría un probable desarrollo de diabetes, relacionada a la persistencia del parásito en el huésped, similar a lo sugerido por otros autores en un modelo de infección con *T. cruzi* (cepa Brazil) en animales CD-1 [174]. En un trabajo reciente de Nagajyothi y col. (2012), se reportó un aumento del parasitismo en las células β del páncreas de animales CD-1, encontrándose valores disminuidos de insulina durante las fases aguda y crónica de la infección con *T. cruzi* (cepa

Brazil) [174]. Este fenómeno podría explicar, al menos en parte, la hipoinsulinemia observada en nuestro modelo de infección y obesidad a las 12 y 24 semanas de tratamiento. Nuestros hallazgos no son coincidentes con lo reportado por este grupo a las 4 semanas, lo que podría ser consecuencia de la exacerbada respuesta inflamatoria, que se gatilla durante la etapa aguda de la infección (Figura 26), además de las evidentes diferencias entre los modelos experimentales utilizados. Si bien, la infección crónica con *T. cruzi* resultó en una disminución significativa de obesidad central y de esteatosis hepática, un fuerte aumento en el infiltrado celular en TAV e hígado (Figuras 21 y 18), así como un aumento en los niveles sistémicos de transaminasas (Figura 19), fueron apreciados a las 12 semanas en comparación con el grupo DO. Es de interés mencionar, que los niveles elevados de la transaminasa ALT reflejan, principalmente, daño funcional hepático. En relación, en un trabajo publicado por nuestro laboratorio en un modelo de sobrepeso e infección con *T. cruzi*, reportamos que el parásito sería un factor de riesgo potencial para el desarrollo de NASH, ya que disminuye la esteatosis pero incrementa la inflamación y el estrés oxidativo a nivel local [157].

Recientemente, se reportó una evidente relación entre la disfunción de las células β pancreáticas y la inflamación mediada a través de la vía FFA-TLR4/ MyD88 [175]. En este contexto, nuestros resultados mostraron que la ausencia de señalización de TLR4 produjo un efecto beneficioso sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos a nivel sistémico en todos los grupos comparado a los WT (Figuras 17 vs. 14). No obstante, la ausencia de este receptor no fue capaz de proteger a los animales DO del acúmulo ectópico de lípidos en hígado, aunque sí del daño funcional a los animales DO+, a diferencia de lo observado en los animales WT (Figuras 20 vs. 19).

La bibliografía ha demostrado ampliamente que la deficiencia de este receptor protege a los animales de la IR y reduce la acumulación de TAV, la esteatosis hepática y la inflamación vascular después de la administración de una HFD [21, 157, 176]. Nuevamente, en nuestro modelo, la fructosa parecería jugar un papel clave en este proceso. Avalando esta hipótesis, resultados de nuestro laboratorio, demostraron recientemente la protección del desarrollo de NASH, conferida por la ausencia de TLR4 en un modelo de sobrepeso (14% grasas) e infección con *T. cruzi* [157].

Mediante la cuantificación sistémica de triglicéridos y colesterol total se pudo evaluar el metabolismo de lípidos y encontramos que este modelo crónico de obesidad desarrolló una dislipidemia mixta, reflejada por incrementos significativos de ambos parámetros a las 24 semanas (Figura 14). Este fenómeno se acompañó de alteraciones cardiovasculares detectadas a partir de las 12 semanas. Se encontraron lípidos ectópicos acumulados a nivel cardíaco (intramiocardio), consistentes con esteatosis cardíaca y en aorta, una hipertrofia de las células adiposas adventiciales y disturbios en la arquitectura plana normal del endotelio vascular (Figuras 15 y 16).

Recientemente, Noyes y col. (2014) han resaltado la importancia de la acumulación de lípidos y FFA intramiocárdicos como factores involucrados en el desarrollo de esteatosis cardíaca en humanos [36]. De manera interesante, nuestro modelo se asemeja a lo que ocurre con las co-morbilidades asociadas a la obesidad en humanos.

La presencia del parásito en este contexto mejoró la dislipemia sistémica y disminuyó el contenido lipídico en corazón y aorta; sin embargo, observamos la presencia de focos inflamatorios dispersos a nivel tisular, reflejando un aumento en la respuesta inflamatoria local (Figuras 14-16). En este contexto, la mejora en la dislipemia producida por la presencia del agente infeccioso podría estar relacionada al hecho de que el parásito tiene una maquinaria metabólica de lípidos *de novo* incompleta y necesita incorporar los lípidos del huésped para satisfacer sus propios requerimientos [177].

Debido a que la hipercolesterolemia, la inflamación y la infección son factores de riesgo pro-aterogénicos [35, 38], evaluamos los niveles sistémicos de la apoB100, molécula constitutiva de las LDL, junto al perfil lipoproteico a las 24 semanas.

Llamativamente, los grupos sometidos a la dieta obesogénica, DO y DO+I, presentaron valores incrementados de apoB100 acompañados de un aumento de LDL y disminución de HDL -reflejando un perfil lipoproteico alterado- respecto a los grupos controles (Figura 14). Los niveles aumentados de esta apolipoproteína son sugestivos de la presencia de las lipoproteínas pro-aterogénicas conocidas como LDL pequeñas y densas (fenotipo B), las cuales pueden atravesar el endotelio vascular con facilidad y ser oxidadas a nivel subendotelial, contribuyendo al inicio del proceso aterosclerótico [178, 179].

Resulta interesante destacar que el parásito *per se* parecería ser un factor de riesgo pro-aterogénico, ya que el grupo de animales infectados con *T. cruzi* y alimentados con dieta estandar (DC+I), no sólo mostraron un incremento de apoB100 y perfil lipoproteico alterado (fenotipo B), sino también, una fuerte respuesta inflamatoria a nivel vascular. Estos resultados nos permiten postular que el *T. cruzi* sería un factor pro-aterogénico indirecto a través de la respuesta inflamatoria exacerbada que desencadena en el huésped. Sin embargo, no deberíamos descartar la posibilidad de que el parásito pueda tener un efecto directo debido a la colonización de la aorta de los animales infectados.

Nuestros hallazgos son compatibles con los reportados por Sunnemark y col. (2000) en condiciones experimentales diferentes a las nuestras, en ratones CBA/J (resistentes a la aterosclerosis) alimentados con dieta rica en colesterol e infectados con *T. cruzi* a las 12 semanas [37]. Es importante tener presente que el *T. cruzi* tiene una alta afinidad por las lipoproteínas/ colesterol y que depende de los lípidos del huésped para su invasión y sobrevivencia, fenómeno que ha sido demostrado recientemente por Johndrow y col. (2014) [180].

De manera interesante, la presencia de TLR4 contribuiría al proceso inflamatorio y al aumento de la apoB100, ya que se observa un aumento de sus niveles en animales WT comparados a los TLR4^{-/-} (Figuras 14 vs. 17). Esto permitiría especular, al menos en parte, el compromiso de este receptor en la patogénesis inflamatoria de la aterosclerosis [32, 181].

La expansión del TA durante la obesidad es posible debido a los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia de las células adiposas y a la capacidad de dichas células para almacenar grandes cantidades de lípidos en forma de triglicéridos en sus respectivos corpúsculos lipídicos. El tejido graso, ha sido señalado como un reservorio de diversos microorganismos, entre los más estudiados, bacterias y virus. Previamente, se ha reportado que el *T. cruzi* presenta un tropismo diferencial por el TA, entre otros tejidos como el cardíaco y que este constituye un tejido blanco temprano y un reservorio crónico durante la infección con el parásito [138, 147].

La lipólisis del TA constituye una característica clave de la infección aguda con *T. cruzi* y se conoce, a su vez, que la lipólisis altera la homeostasis lipídica [147].

En nuestro modelo de obesidad, los resultados muestran alteraciones en la histomorfología normal del TA, caracterizadas por la hipertrofia de las células adiposas y la formación de CLS –lesiones típicas del TA obeso disfuncional- respecto a nuestro grupo control (DC), a partir de las 12 semanas (Figura 21). Por otro lado, demostramos que la presencia adicional del parásito en este ambiente nutricional, disminuye el tamaño de la célula adiposa e incrementa el infiltrado celular del TA, reforzando lo reportado por otros trabajos [138, 147]. La presencia de CLS en el TA de los animales infectados, DO+I y DC+I, es un fenómeno relevante no demostrado hasta el momento.

Es conocida la participación del TLR2 en el reconocimiento de diferentes antígenos del *T. cruzi*, como la mucina GPI y la proteína parasitaria Rab-5 [141, 142]. En un estudio *in vitro* llevado a cabo en adipocitos 3T3-L1, la infección con *T. cruzi* (cepa Tulahuen) indujo el aumento génico de TLR2 y TLR9 a las 48 y 96 hs post tratamiento [139]. Asimismo, se demostró en un modelo *in vivo* que la infección aguda con *T. cruzi* (cepa Brazil) fue capaz de generar un aumento del ARNm de TLR2 y TLR9 en el TA blanco de los animales infectados [147].

Mediante estudios de inmunofluorescencia directa y western blot, evaluamos la expresión proteica de TLR2 en el TA de animales infectados durante la etapa crónica. Un aumento en la expresión local de este receptor fue observado en ambos grupos infectados a las 24 semanas, siendo significativamente mayor en el grupo DO+I respecto al grupo DC+I y en DC+I comparado al grupo DC (Figura 22). Este fenómeno daría cuenta de un sinergismo existente debido a la presencia simultánea del estímulo nutricional que generaría señales de daño (DAMPs) y del estímulo infeccioso (PAMPs).

Dentro de los receptores de la inmunidad innata, el receptor *scavenger* CD36 se caracteriza por reconocer un amplio espectro de ligandos, incluidas las LDLox y los FFA, incrementados de manera importante en diversos desórdenes metabólicos. De hecho, CD36 se activa en situaciones de hiperglucemia como la que ocurre en la obesidad, IR/ DM2 y es ampliamente reconocida su participación en el inicio y progresión de la aterosclerosis [39]. Su compromiso como primera línea de defensa ante la infección parasitaria con *T. cruzi* ha sido poco estudiado hasta el momento, aunque el reciente rol de CD36 vinculado a la migración de células fagocitarias hacia el TA obeso [124], podría sugerir su participación en el reclutamiento de macrófagos hacia el TA infectado.

Nuestros resultados mostraron un aumento de CD36 en el TAV de los animales sometidos a nuestro tratamiento nutricional más STZ (DO y DO+I) respecto a los animales controles a las 24 semanas. De manera interesante, la mera infección con *T. cruzi* no involucró la participación de este receptor en TAV ya que los animales DC+I no fueron capaces de inducir un aumento de CD36, a diferencia de los animales DO+I (Figura 23). Sin dudas, la desregulación metabólica desencadenada por la dieta y la presencia conjunta de la dieta y el parásito, estaría jugando un papel clave en el compromiso de este receptor en el TAV.

Es probable que el predominio plasmático de ácido palmítico detectado en los animales DO y DO+I por cromatografía gaseosa y la presencia de LDL pequeñas y densas (fenotipo B) observada en estos animales, podrían explicar el compromiso de CD36 a las 24 semanas.

El estrés oxidativo es otro mecanismo crucial en el desarrollo de IR, DM2 y aterosclerosis, asociados a la obesidad [48]. Sin embargo, no es conocido el desbalance de los ROS en la interrelación entre el TA disfuncional obeso y la infección. De hecho, en un estado de obesidad los marcadores de estrés oxidativo se encuentran incrementados; aunque, hasta el momento, ningún estudio ha sido focalizado en el análisis del TA obtenido de animales infectados con *T. cruzi* y sometidos a un *estatus* nutricional calórico como el de la obesidad aquí descrito.

Por ello, evaluamos el efecto de la dieta y la infección con *T. cruzi* sobre la peroxidación lipídica en el TAV, mediante la cuantificación del producto tardío MDA. Demostramos que nuestro modelo de obesidad no fue capaz de inducir, al menos de manera significativa, peroxidación lipídica en el TA obeso a las 24 semanas. Alternativamente, la presencia adicional del parásito resultó en un aumento significativo de los niveles de MDA, respecto a los grupos DO y DC+I (Figura 24). Teniendo en cuenta que ni la infección, ni la dieta *per se* fueron capaces de reflejar un estado oxidativo a nivel lipídico, podemos suponer que la combinación de diversos estímulos inflamatorios crónicos provenientes de la carga nutricional y de la infección, serían los responsables de este fenómeno oxidativo observado en el TA.

Wen y col. (2014) demostraron el aumento de marcadores de estrés oxidativo en el TA de animales CD-1 infectados con *T. cruzi* (5×10^4 , cepa Brazil) a los 15, 30 y 130 días post infección [48]. Las discrepancias con nuestros resultados podrían atribuirse a los tiempos estudiados (15, 30 y 130 días vs. 24 semanas), la susceptibilidad de los animales utilizados (CD-1 vs. C57BL/6) y/o la cepa y cantidades de parásitos empleadas (Brazil vs. Tulahuen; 5×10^4 vs 500 tripomastigotes).

La respuesta patogénica que se desencadena en la obesidad ha sido atribuida, en gran medida, a la disfunción del TA. La consecuente secreción de un variado panel de adipocinas, da inicio a una serie de eventos pro-inflamatorios y oxidativos, que involucran la participación e interacción entre receptores y células del sistema inmune. Estos procesos comprenden una coordinada interacción entre varios tipos celulares que componen la fracción estromal del TA (SVF) y entre ellos, los macrófagos han sido foco de numerosos estudios debido a su acumulación progresiva durante la expansión del TA obeso [89, 98].

Diversos trabajos han intentado caracterizar los macrófagos del TA (ATM) de acuerdo al sistema M1 vs. M2 [47]. A pesar que el consenso general en el área es que la obesidad induce la polarización de M Φ de tipo M2 –predominantes en el TA delgado- a M Φ de tipo M1 –predominantes en el tejido inflamado [49, 89, 101], diversas líneas de investigación han demostrado, recientemente, una polarización prevalente y dinámica hacia el fenotipo M2 durante la obesidad, tanto en animales como en humanos [104, 105].

Existen escasos estudios que han evaluado el infiltrado de ATM durante la infección con *T. cruzi*: uno reportando el aumento de RNAm de macrófagos F4/80+ en el TA de animales CD-1 a los 15 días de la infección con el parásito (cepa Brazil) [147], otro mostrando que dicho incremento no resultó exacerbado en animales *db/db* infectados [182] y por último, Combs y col. (2005) demostrando el incremento de células F4/80+ en TA epididimal de animales CD-1 por inmunohistoquímica [138]. Sin embargo, no existen reportes que demuestren el tipo de polarización que predomina entre los M Φ que infiltran el TA durante la infección con *T. cruzi* y menos aún, en un contexto calórico excesivo como el de la obesidad.

Nuestros resultados mostraron un incremento significativo del número de leucocitos en TAV de todos los grupos comparados con DC, a las 12 semanas. Cabe destacar que la mayor infiltración celular fue observada en el TAV del grupo DO+I, respecto a los grupos DO y DC+I, debido probablemente a la presencia de estímulos simultáneos provenientes de la infección parasitaria y la desregulación metabólica (Figura 25). Entre los leucocitos detectados, comprobamos que el fenotipo de macrófagos predominante, en todos los grupos, fue de tipo M2 (F4/80+ CD206+ CD11c-). Nuevamente, observamos que el grupo DO+I evidenció el mayor aumento en el número de ATM. En contraposición, encontramos un escaso número de macrófagos con fenotipo M1 (F4/80+CD206-CD11c+) en todas las condiciones experimentales analizadas (Figura 25), a diferencia de lo publicado

previamente por nuestro grupo a nivel hepático en un modelo de sobrepeso e infección con *T. cruzi* [157].

Este comportamiento peculiar de los MΦ en el TAV en nuestro modelo de obesidad e infección, podría ser consecuencia de: i) una disminución en el número de MΦ M1 durante la eliminación del parásito intracelular; ii) la proliferación de MΦ M2 con la finalidad de mantener la homeostasis tisular y promover la sobrevivencia del parásito; iii) la reportada capacidad de los MΦ M2 de secretar citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas dependiendo del ambiente en el que se encuentren [98].

Entre las quimiocinas producidas por el TA, MCP1 y su receptor CCR2, desempeñan un papel relevante en el reclutamiento de monocitos/MΦ durante la obesidad, insulino resistencia y DM2 [14, 98]. Por citometría de flujo evaluamos la producción intracelular de MCP1 en macrófagos F4/80+ de la SFV y encontramos que la mayor cantidad de esta quimiocina proviene de MΦ M2, en todos los grupos. Resulta interesante destacar el incremento significativo de MCP1 observado en el grupo DO+I respecto a DO y DC+I, coincidente con el aumento del número de MΦ en este grupo a las 12 semanas. Del mismo modo, aunque en menor cantidad, mostramos que el número absoluto de MΦ M1 que contribuyen con la producción de esta quimiocina, es significativo en los animales DO+I en relación a DO y DC+I (Figura 25).

El incremento local de MCP1 fue observado en las CLS del TAV de animales DO+I, acompañado de un aumento significativo a nivel sistémico, a las 4 semanas (Figuras 25 y 26). En este sentido, si bien se ha reportado que la mayoría de los MΦ que se encuentran alrededor de adipocitos muertos (CLS) son del tipo M1 [97], Kraakman y col. (2014) revelaron que los MΦ M2 pueden proliferar dentro de las CLS con la finalidad de remodelar el tejido dañado [98].

Considerando el sinergismo existente entre la dieta y el parásito en la respuesta inflamatoria local en corazón, aorta, hígado y TAV, decidimos evaluar la respuesta inflamatoria sistémica. Entre las citocinas pro-inflamatorias analizadas, encontramos a las 4 semanas, incrementos significativos en la producción de IL-6 en los grupos infectados DO+I y DC+I comparado a los grupos DO y DC, respectivamente. En relación al grupo DC+I, Combs y col. (2005) reportaron un comportamiento similar en ratones CD-1 infectados con *T. cruzi* (cepa Brazil), hallando niveles elevados de IL-6 y MCP1 a los 15 y 30 días post infección [138]. A las 24 semanas, sólo los grupos que recibieron el tratamiento obesogénico, DO y DO+I, evidenciaron un aumento marcado de IL-6, siendo significativo en el grupo DO+I respecto a DO y DC+I. Esto revelaría, en cierta forma, el sinergismo existente entre ambas patologías inflamatorias crónicas: la obesidad y la enfermedad de Chagas (Figura 26).

Asimismo, encontramos un aumento significativo en los niveles sistémicos de TNFα en la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en los animales DO+I respecto a los animales

DO y DC+I. Este incremento, observado sólo en el grupo infectado DO+I y no en DC+I, podría deberse al hecho de que el primer grupo desarrolla un pico de parasitemia abrupto a los 35 días post infección, a diferencia de lo observado en los animales DC+I (20 días) (Figura 28). El incremento de TNF α se produce principalmente durante el pico de parasitemia y sería responsable de la caquexia y posterior muerte de los animales durante la etapa aguda de la infección [183].

En nuestro modelo, el perfil de proteínas plasmáticas en los grupos infectados, reveló un aumento de las fracciones α -1 y α -2, coincidentes con el incremento de IL-6 y/o TNF α a las 4 semanas (Figuras 27 y 26). Estas citocinas serían responsables de estimular la síntesis hepática de proteínas de fase aguda en diversas situaciones inflamatorias [154].

En conjunto, nuestros resultados reflejan un estado inflamatorio exacerbado local y sistémico, en el grupo que recibe conjuntamente el tratamiento obesogénico y la infección con *T. cruzi* (DO+I), en comparación con el expuesto sólo al tratamiento obesogénico (DO) y con el desafiado con el parásito (DC+I). Esta observación está en concordancia con lo descrito por Nagajothi y col. (2010) en un modelo genético de obesidad (*db/db*) e infección con *T. cruzi* [182], donde hallaron niveles incrementados de TNF α , IL-6 y MCP1 a los 27 días post infección, una alta tasa de mortalidad y una importante infiltración cardíaca, comparado a los animales WT. Considerando que IL-6 y TNF α estimulan la actividad lipolítica [154], especulamos que podrían ser contribuyentes claves de la reducción lipídica tisular (Figuras 15, 16, 18 y 21) y la disminución de los parámetros morfométricos (Figura 10), demostradas en los grupos infectados con *T. cruzi*.

Un desbalance en los niveles de adipocinas caracterizado por una sobreproducción de leptina –pro-inflamatoria- y una disminución de adiponectina – anti-inflamatoria- fue evidenciado a las 4 semanas en grupo el DO (Figura 26). La hiperleptinemia demostrada a partir de las 12 semanas es sugestiva de un estado de resistencia a la leptina, con niveles de adiponectina similares al grupo DC. Esto concuerda con el desarrollo de IR detectado en estos animales y reportado por otros autores [62, 63]. Está ampliamente documentado que los niveles elevados de glucosa e insulina promueven la expansión del TA y estimulan crónicamente los niveles de leptina [59].

La hiperleptinemia en el grupo DO fue significativamente mayor respecto a DO+I, indicando que la presencia crónica del parásito podría contribuir a la disminución de la leptina. Por el contrario, los niveles de adiponectina en los grupos infectados con *T. cruzi* estuvieron disminuidos en la etapa aguda y crónica, siendo significativos respecto a los grupos DO y DC a las 12 y 24 semanas (Figura 26). Esta observación ha sido reportada previamente por otros autores durante la etapa aguda de esta infección parasitaria [138, 147, 182]. Tanowitz y col. (2010) demostraron la disminución de la adiponectina sistémica hasta los 27 días de la infección con *T. cruzi* en animales *db/db* [182] y recientemente (2012), la disminución de adiponectina en TA a los 15 días de la infección en animales

CD-1 alimentados con dieta estandar [147]. Previamente, Combs y col. (2005) reportaron la disminución de esta adipocina a los 30 días post infección (cepa Brazil) en animales CD-1 [138]. Esto también fue demostrado en adipocitos 3T3-L1, luego de 96 hs de estímulo con tripomastigotes (cepa Tulahuen) en diferentes relaciones célula: parásito [139].

La adiponectina posee una función protectora a nivel cardiovascular [14, 81] y niveles bajos se asocian a una mayor incidencia de alteraciones cardiovasculares, insulino resistencia y diabetes. De esta manera, nuestros hallazgos podrían sugerir un incrementado riesgo cardiovascular asociado a los animales infectados con *T. cruzi*. Cabe recordar al respecto, el fenotipo B (LDL pequeñas y densas) que observamos en los animales DO+I y DC+I, además de las alteraciones histomorfológicas evidenciadas en corazón y aorta durante la etapa crónica de la infección.

Adicionalmente, mostramos una miocarditis chagásica aguda –caracterizada por fuerte infiltrado local y presencia de nidos de amastigotes- en el grupo DO+I a los 35 días post infección (Figura 28). Esto resultó coincidente con el desarrollo de IR periférica aguda y el aumento de citocinas pro-inflamatorias sistémicas (IL-6 y TNF α), MCP1, leptina y disminución de adiponectina (con propiedades anti-inflamatorias). Este escenario pro-inflamatorio agudo generado por la presencia del agente infeccioso y potenciado por la dieta obesogénica, afectó la parasitemia y sobrevida de los animales DO+I, resultando menor que la del grupo DC+I (Figura 28).

El TA está compuesto por diversos tipos celulares además del adipocito [89]. En un contexto inflamatorio, el TA es infiltrado por una gran cantidad de leucocitos; razón por la cual, numerosos cuestionamientos sobre la posible contribución del adipocito al proceso inflamatorio han surgido y estas células se han convertido en el foco de recientes investigaciones.

En nuestro trabajo, decidimos poner atención al estudio de la célula adiposa como principal componente del TA. La caracterización de los eventos moleculares y celulares que ocurren en los adipocitos han sido objeto de numerosos estudios mediante el uso de diversos modelos *in vitro* [184]. La línea inmortalizada de ratón 3T3-L1 ha sido una de las más utilizadas para la diferenciación hacia la línea adiposa. Si bien es un modelo perfectamente establecido, que refleja de manera fiel lo que ocurre a nivel celular y molecular en los adipocitos, debe tenerse en cuenta la dificultad de extrapolar los procesos observados *in vitro* con lo que ocurre realmente *in vivo*. Una de las limitaciones más importantes se relaciona al hecho de que estas células existen fuera de un contexto de matriz celular y no son capaces de interactuar con otros tipos celulares presentes en TA, ni de responder a los estímulos sistémicos producidos en una determinada situación.

No obstante, en el presente trabajo, el estudio de diferentes estímulos con ácidos grasos –incrementados en la obesidad e IR- y tripomastigotes (cepa Tulahuen), nos

permitió analizar la participación de la célula adiposa en este contexto nutricional e infeccioso.

Nuestro diseño experimental demostró que concentraciones altas de ácidos grasos (150 y 250 μM) fueron lipotóxicas para las células adiposas, afectando negativamente su viabilidad celular a las 24 hs (Figura 29). Esto podría reflejar lo que ocurre en una situación de obesidad/ IR, en la que elevadas cantidades de ácidos grasos –lipotoxicidad– producto de la lipólisis del adipocito, repercute negativamente sobre la fisiología normal de estas células, resultando en necrosis celular y formación de CLS. Cabe mencionar, que este fenómeno de lipotoxicidad se observó no solo luego del tratamiento con ácidos grasos saturados, sino también con el ácido oleico (mono-insaturado). Cnop y col. (2001) dieron cuenta de este fenómeno en células β pancreáticas aisladas de ratas Zucker y expuestas a ácido palmítico y oleico, detectando una citotoxicidad dosis-dependiente a las 48 hs de tratamiento [185].

El receptor CD36 ha sido implicado en la incorporación de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior celular [120]. En nuestro modelo *in vivo*, observamos la participación de CD36 en TAV de los grupos DO y DO+I y atribuimos su incremento, principalmente a la presencia de DAMPs provenientes de la dieta y/o generados durante el proceso metabólico crónico (Figura 23). Nuestros hallazgos *in vitro* no demostraron la expresión constitutiva de este receptor en células adiposas controles y la presencia de ácidos grasos (DAMPs) no fue suficiente para inducir su expresión proteica a las 24hs post tratamiento. Por el contrario, nuestros resultados mostraron que la presencia adicional del parásito (relación 2:1) fue capaz de inducir la expresión de CD36, la cual no fue potenciada por la presencia de ácidos grasos (Figura 30). Esto sugiere que la presencia de PAMPs, provenientes del parásito, induce eficazmente la expresión de este receptor en los adipocitos. Probablemente, las concentraciones de ácidos grasos utilizadas en los ensayos experimentales, no fueron suficientes para reflejar lo que ocurre en la compleja situación real. De hecho, hipotetizamos que el parásito alojado en el TA y particularmente en el adipocito, podría manipular la respuesta inmune del huésped y favorecer su supervivencia y proliferación celular.

La respuesta inflamatoria del adipocito en presencia de ácidos grasos y del parásito, se evaluó cuantificando citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de cultivo a las 24 y 48 hs post tratamiento (Figura 31). El tratamiento con ácidos grasos indujo una leve secreción no significativa de IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ a las 24 hs, respecto a las células controles. Esto indicaría una respuesta inflamatoria de grado bajo, como la que se observa en la obesidad. A las 24 hs, la presencia del *T. cruzi* no estimuló la secreción de IL-6 y disminuyó significativamente la de $\text{TNF}\alpha$ respecto a la estimulada por los ácidos grasos. Sin embargo, a las 48 hs se observó un incremento significativo de ambas citocinas inducido por el *T. cruzi* y la presencia conjunta del parásito y ácidos grasos, reflejando una marcada

respuesta inflamatoria. Cabe destacar que dicha respuesta, generada por la presencia del parásito en la célula adiposa, se correlacionó con la disminución de la viabilidad celular a las 48 hs luego del tratamiento con *T. cruzi*.

PPAR γ es un factor de transcripción que participa en la proliferación celular, diferenciación y regulación de la inflamación en células adiposas, principalmente [47]. Su participación como un jugador clave en el desarrollo de varias patologías inflamatorias ha sido extensamente estudiada; sin embargo, su compromiso en la inmunoregulación de ciertas enfermedades infecciosas ha sido recientemente abordada como un tópico de gran interés por los investigadores [150]. Al respecto, se ha demostrado que este factor de transcripción se encuentra aumentado durante la infección por patógenos intracelulares, ejerciendo un papel clave en la modulación de la respuesta inmune del huésped para favorecer la carga infecciosa, sugiriendo que los patógenos estimularían la actividad de este factor de transcripción como un mecanismo de escape /evasión [186].

Nuestros resultados *in vitro* mostraron un incremento en la expresión de PPAR γ a las 24 hs del tratamiento con *T. cruzi* y ácidos grasos, lo que podría relacionarse a la disminución de la respuesta inflamatoria demostrada a este tiempo. Por el contrario, a las 48 hs la expresión de PPAR γ disminuyó considerablemente, coincidiendo con el aumento de las citocinas y la respuesta inflamatoria desencadenada (Figura 32). Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Tanowitz y col. (2008) a las 48, 72 y 96 hs de la infección con *T. cruzi* (cepa Tulahuen) en la misma línea celular, momento a partir del cual, pudieron evidenciar la presencia de un fenotipo inflamatorio en la célula adiposa [139]. Recientemente, fue demostrado en ratones CD-1 infectados con *T. cruzi*, un aumento de PPAR γ en el TA blanco asociado a un control de la respuesta inflamatoria, a los 15 días de infección [147].

La participación clave de PPAR γ dependiente de CD36, ha sido demostrada en la resolución de la inflamación y modulación de la respuesta inmune frente a ciertas infecciones parasitarias, entre ellas, por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium chabaudi* [150]. Esto podría estar relacionado con nuestros hallazgos de PPAR γ y el aumento concomitante de CD36 en adipocitos maduros, a las 24 hs post tratamiento.

La lipólisis y la lipofagia son dos fenómenos asociados a la movilización de lípidos (ácidos grasos) desde la célula adiposa [17]. Nagajyothi y col. (2012) demostraron la participación de lipasas y la consecuente lipólisis desencadenada por el *T. cruzi*, en el TA de ratones CD-1 infectados [147], siendo la lipólisis una característica importante de esta infección. Más tarde, observaron este fenómeno en TA y corazón utilizando el mismo modelo murino de infección, aunque alimentados con dietas de bajo y alto contenido en grasas [187].

En esta tesis evaluamos el tamaño de los corpúsculos lipídicos presentes en los adipocitos maduros y encontramos un aumento del tamaño de estas organelas en las

células tratadas con ácidos grasos. Por el contrario, destacamos que la presencia del parásito indujo corpúsculos lipídicos de menor tamaño comparados con las células controles, siendo este fenómeno, una posible consecuencia de la lipólisis desencadenada por el *T. cruzi* en la célula adiposa (Figura 33), como ha sido previamente demostrado por otros autores [138].

En esta tesis, los estudios *in vitro*, demostraron que los amastigotes presentes en las células infectadas se encontraban agrupados alrededor de los corpúsculos lipídicos (Figura 35). Un hallazgo similar fue reportado por Combs y col. (2005), al comparar micrografías electrónicas de adipocitos 3T3-L1 infectados con *T. cruzi* y adipocitos sin infectar [138]. Estas observaciones sugieren que el parásito podría tener afinidad por los eventos bioquímicos que tienen lugar en la superficie de estas organelas, como ser, la lipólisis mediada por la lipasa hormono sensible, proporcionando así una posible explicación a la afinidad elevada de los parásitos por este tipo celular [188].

Brasaemle y col. (2004) demostraron la presencia de ADRP en los corpúsculos lipídicos aislados de células adiposas 3T3-L1 estimuladas lipolíticamente, aunque no ocurrió así en adipocitos bajo condiciones basales [96]. Nuestros hallazgos revelaron la expresión aumentada de ADRP en las células tratadas por 24 hs con ácidos grasos y/o ácidos grasos y *T. cruzi*, a diferencia de lo observado en las células controles (Figura 36). Esto sugeriría la presencia de células lipolíticamente activas luego del tratamiento por 24 hs con: i) ácidos grasos –de manera similar a lo que ocurre en una condición de insulino resistencia; ii) parásitos –mimetizando lo que ocurre en el TA de animales infectados con *T. cruzi*; iii) la combinación de ambos estímulos –como lo que ocurre en el contexto de infección con *T. cruzi* y carga nutricional excesiva.

Además, realizamos un estudio preliminar en pre-adipocitos 3T3-L1 con el propósito de analizar la expresión de ADRP y PPAR γ , luego del estímulo con ácidos grasos y *T. cruzi*. Nuestras observaciones parecerían indicar que estas células carecen de la expresión constitutiva de las moléculas ADRP y PPAR γ y que el estímulo con ácidos grasos, a excepción del palmítico, sería capaz de inducir la expresión de ADRP, pero no de PPAR γ , en estas células indiferenciadas. Alternativamente, el *T. cruzi* ejercería un efecto potenciador sobre la expresión de ADRP en pre-adipocitos. Asimismo, encontramos que el parásito influenciaría de manera positiva la expresión del factor de transcripción PPAR γ , expresión que se vería exacerbada por la presencia conjunta de los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Figura 37).

Estos estudios preliminares podrían sugerir, por un lado, que la infección con *T. cruzi* favorecería la adipogénesis –función dependiente de PPAR γ - y por el otro, la probable modulación en la biogénesis de corpúsculos lipídicos –evidenciado a través del incremento de ADRP- como ha sido reportado en macrófagos infectados con este parásito [170].

Tomando estas evidencias en conjunto, mostramos que nuestro modelo con dieta moderada en grasa, fructosa y STZ induce eficazmente obesidad e insulino resistencia, acompañada de alteraciones metabólicas, cardiovasculares y hepáticas. La infección con *T. cruzi* exacerba la respuesta inflamatoria aguda y crónica sistémica, generada en este contexto nutricional, disminuyendo el contenido lipídico tisular y la obesidad, pero aumentando la inflamación local y con ello, la disfunción cardiovascular y hepática. Particularmente, observamos que la disfunción del TAV participa de manera activa en la respuesta inflamatoria sistémica, tanto en la obesidad como en la infección parasitaria en dicho *status* nutricional, principalmente, a través de la secreción de adipocinas, infiltración de macrófagos y compromiso de receptores de la inmunidad innata. Asimismo, demostramos la contribución del receptor TLR4 en la desregulación metabólica en la obesidad e infección con *T. cruzi*, no así, en la acumulación de lípidos a nivel del TAV e hígado. El adipocito *in vitro*, modula inicialmente la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección con *T. cruzi* y con ácidos grasos, en parte, merced a la participación de PPAR γ , lo cual favorecería la proliferación y sobrevida del parásito en esta célula blanco. Luego, dicha proliferación parecería ser contraproducente para el propio parásito, ya que se evidenció un aumento en la respuesta inflamatoria en la célula adiposa y la consecuente disminución de PPAR γ y viabilidad celular.

6. CONCLUSIÓN

La preocupante prevalencia de la obesidad y la enfermedad de Chagas a nivel mundial, ha resaltado la compleja interacción existente entre el metabolismo y el sistema inmune, ubicando a la inflamación como un mecanismo denominador común entre ambas patologías. Frente a esta situación nos planteamos algunos interrogantes tales como ¿será que la inflamación desencadenada por el parásito contribuiría a la etiología inflamatoria de la obesidad?, ¿será que la obesidad favorecerá la progresión de la infección con *T. cruzi*, debido a la posibilidad del parásito de contar con un exceso de nutrientes para su supervivencia y proliferación?, o tal vez ¿será que la inflamación crónica de grado bajo en la obesidad contribuirá a la defensa del huésped a favor de la eliminación del agente infeccioso?.

El TA y el adipocito, su principal célula constitutiva, desempeñan un papel clave en la patogénesis de la obesidad y las desregulaciones metabólicas asociadas. La interrelación entre este tejido y los agentes infecciosos ha ganado recientemente la creciente atención de los investigadores. De hecho, actualmente se conoce que el TA y los adipocitos constituyen sitios blanco de la infección con *T. cruzi* y representan importantes reservorios del parásito.

Nuestros resultados resaltan la respuesta inflamatoria exacerbada, generada por la presencia del parásito en un contexto nutricional capaz de inducir obesidad en animales C57BL/6. La inflamación demostrada a nivel local en TAV, hígado, corazón y aorta y a nivel sistémico, impacta sobre la homeostasis metabólica de glúcidos y lípidos, induciendo alteraciones cardiovasculares y hepáticas, contribuyendo a la patogénesis de enfermedades inflamatorias tales como la diabetes, la esteatohepatitis y la aterosclerosis.

La disminución del TAV y del contenido lipídico en general, se relaciona con una mejora en los parámetros morfométricos alterados en la obesidad; situación que se vincula con la lipólisis y la necesidad de incorporación de nutrientes por parte del parásito para asegurar su supervivencia y replicación en el huésped.

En conjunto, **nuestro modelo** podría potencialmente contribuir a un progreso en el área de la obesidad; en parte, porque ofrece la posibilidad de realizar estudios empíricos en un modelo animal que se asemeja a lo acontecido en el contexto clínico y fisiológico real, evitando así la necesidad de recurrir al uso de modelos extremos/drásticos de obesidad. El conocimiento de los posibles mecanismos implicados en la desregulación metabólica, asociados a la infección parasitaria con *T. cruzi*, podría contribuir a la comprensión de la interacción patógeno-huésped. Esto aportaría bases sólidas para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas para estas patologías que llevan implícito un gran riesgo para la Salud Pública mundial, debido a la elevada morbi-mortalidad de los pacientes afectados.

La eficacia del tratamiento con agonistas de PPARs en la infección con *T. cruzi* permanece esencialmente sin explorar [188]. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento resaltan el papel de PPARs en la resolución de la inflamación y la remodelación tisular. Nuestros resultados *in vitro* demostraron la participación de PPAR γ en la modulación de la respuesta inflamatoria desencadenada por el adipocito frente a la infección con *T. cruzi*.

In vivo, la presencia de macrófagos con fenotipo M2 en TAV, asociados a la resolución de la inflamación y la remodelación tisular, podrían estar vinculados con la expresión de este factor de transcripción. De este modo, sugerimos que los ligandos de PPARs podrían ser en un futuro mediato, fuentes potenciales para la implementación de terapias farmacológicas que contribuyan a una mejora en la Salud de los pacientes obesos y chagasicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Desruisseaux MS, Nagajyothi, Trujillo ME, Tanowitz HB and Scherer PE. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun*. 2007; 75(3):1066-1078.
2. Schaffler A and Scholmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in immunology*. 2010; 31(6):228-235.
3. Veldhoen M and Veiga-Fernandes H. Feeding immunity: skepticism, delicacies and delights. *Nature immunology*. 2015; 16(3):215-219.
4. WHO (2015). Obesity and overweight. Factsheet 311.
5. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR and Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *The American journal of clinical nutrition*. 2000; 72(3):694-701.
6. Chan DC, Watts GF, Barrett PH and Burke V. Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2003; 96(6):441-447.
7. Janssen I, Heymsfield SB, Allison DB, Kotler DP and Ross R. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. *The American journal of clinical nutrition*. 2002; 75(4):683-688.
8. Piya MK, McTernan PG and Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *The Journal of endocrinology*. 2013; 216(1):T1-T15.
9. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr. and O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007; 116(1):39-48.
10. Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ and Taylor HA. Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010; 95(12):5419-5426.
11. Wellen KE and Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115(5):1111-1119.
12. Tateya S, Kim F and Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4:93.

13. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*. 2015; 6(3):456-480.
14. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ and Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews Immunology*. 2011; 11(2):85-97.
15. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H and Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2007; 99(4A):15B-26B.
16. Houstis N, Rosen ED and Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006; 440(7086):944-948.
17. Singh R and Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *International journal of cell biology*. 2012; 2012:282041.
18. Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091):87-91.
19. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N and Claycombe KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular aspects of medicine*. 2012; 33(1):26-34.
20. Fernandez-Real JM and Pickup JC. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55(2):273-278.
21. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW and Schwartz MW. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation research*. 2007; 100(11):1589-1596.
22. Kim JK. Endothelial nuclear factor kappaB in obesity and aging: is endothelial nuclear factor kappaB a master regulator of inflammation and insulin resistance? *Circulation*. 2012; 125(9):1081-1083.
23. Stojisavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L and Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014; 20(48):18070-18091.
24. Vos MB and Lavine JE. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013; 57(6):2525-2531.
25. Medici V, Ali MR, Seo S, Aoki CA, Rossaro L, Kim K, Fuller WD, Vidovszky TJ, Smith W, Jiang JX, Maganti K, Havel PJ, Kamboj A, Ramsamooj R and Torok NJ. Increased soluble leptin receptor levels in morbidly obese patients with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity*. 2010; 18(12):2268-2273.

26. Zhang L, Song H, Ge Y, Ji G and Yao Z. Temporal relationship between diet-induced steatosis and onset of insulin/leptin resistance in male wistar rats. *PLoS one*. 2015; 10(2):e0117008.
27. Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH and Barzilai N. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007; 21(1):53-60.
28. Basciano H, Federico L and Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & metabolism*. 2005; 2(1):5.
29. Tappy L and Le KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2012; 36(6):554-560.
30. Lonardo A, Lombardini S, Ricchi M, Scaglioni F and Loria P. Review article: hepatic steatosis and insulin resistance. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2005; 22 Suppl 2:64-70.
31. Attie AD and Scherer PE. Adipocyte metabolism and obesity. *Journal of lipid research*. 2009; 50 Suppl:S395-399.
32. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2):115-126.
33. Erridge C. The roles of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of innate immunity*. 2009; 1(4):340-349.
34. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010; 17(4):332-341.
35. Sivapalaratnam S, Motazacker MM, Maiwald S, Hovingh GK, Kastelein JJ, Levi M, Trip MD and Dallinga-Thie GM. Genome-wide association studies in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2011; 13(3):225-232.
36. Noyes AM, Dua K, Devadoss R and Chhabra L. Cardiac adipose tissue and its relationship to diabetes mellitus and cardiovascular disease. *World journal of diabetes*. 2014; 5(6):868-876.
37. Sunnemark D, Harris RA, Frostegard J and Orn A. Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of *Trypanosoma cruzi* infection and a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*. 2000; 153(2):273-282.
38. Lehr HA, Sagban TA, Ihling C, Zahringer U, Hungerer KD, Blumrich M, Reifenberg K and Bhakdi S. Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation*. 2001; 104(8):914-920.

39. Mathieu P, Pibarot P and Despres JP. Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis. *Vascular health and risk management*. 2006; 2(3):285-302.
40. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; 24(1):23-28.
41. Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I and Marcel YL. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell metabolism*. 2011; 13(6):655-667.
42. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; 47(8 Suppl):C7-12.
43. Saely CH, Geiger K and Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. 2012; 58(1):15-23.
44. Fernandez M, Acuna MJ, Reyes M, Olivares D, Hirsch S, Bunout D and de la Maza MP. Proliferation and differentiation of human adipocyte precursor cells: differences between the preperitoneal and subcutaneous compartments. *Journal of cellular biochemistry*. 2010; 111(3):659-664.
45. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372(6505):425-432.
46. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*. 2006; 14 Suppl 5:242S-249S.
47. Han JM and Levings MK. Immune regulation in obesity-associated adipose inflammation. *Journal of immunology*. 2013; 191(2):527-532.
48. Wen JJ, Nagajyothi F, Machado FS, Weiss LM, Scherer PE, Tanowitz HB and Garg NJ. Markers of oxidative stress in adipose tissue during *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*. 2014; 113(9):3159-3165.
49. Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007; 117(1):175-184.
50. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, Blin-Wakkach C, Anty R, Iannelli A, Gugenheim J, Tran A, Bouloumie A, Gual P and Wakkach A. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*. 2012; 61(9):2238-2247.

51. Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, Sipula IJ, Dedousis N, Scott DK, Morel PA, Thomson AW and O'Doherty RM. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012; 61(9):2330-2339.
52. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS and Shi GP. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nature medicine*. 2009; 15(8):940-945.
53. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N and Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *Journal of lipid research*. 2008; 49(9):1894-1903.
54. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR and Spiegelman BM. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*. 1987; 237(4813):402-405.
55. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K and Matsuzawa Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature medicine*. 1996; 2(7):800-803.
56. Hu E, Liang P and Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271(18):10697-10703.
57. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y and Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 221(2):286-289.
58. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G and Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270(45):26746-26749.
59. Friedman JM and Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395(6704):763-770.
60. Dalskov SM, Ritz C, Larnkjaer A, Damsgaard CT, Petersen RA, Sorensen LB, Ong KK, Astrup A, Molgaard C and Michaelsen KF. The role of leptin and other hormones related to bone metabolism and appetite regulation as determinants of gain in body fat and fat-free mass in 8-11-year-old children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015; 100(3):1196-1205.

61. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C and Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 105(12):1827-1832.
62. Argente-Arizon P, Freire-Regatillo A, Argente J and Chowen JA. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Frontiers in endocrinology*. 2015; 6:42.
63. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H and Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008; 135(1):61-73.
64. Denroche HC, Huynh FK and Kieffer TJ. The role of leptin in glucose homeostasis. *Journal of diabetes investigation*. 2012; 3(2):115-129.
65. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP and Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011; 301(4):E567-584.
66. Thangaraju P, Chakrabarti A, Banerjee D, Hota D, Tamilselvan, Bhatia A and Gupta A. Dual blockade of Renin Angiotensin system in reducing the early changes of diabetic retinopathy and nephropathy in a diabetic rat model. *North American journal of medical sciences*. 2014; 6(12):625-632.
67. Chang CC, Wu MJ, Yang JY, Camarillo IG and Chang CJ. Leptin-STAT3-G9a Signaling Promotes Obesity-Mediated Breast Cancer Progression. *Cancer research*. 2015.
68. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Pomerio A and Trovati M. Adipocytokines in atherosclerosis: focus on platelets and vascular smooth muscle cells. *Mediators of inflammation*. 2010; 2010:174341.
69. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW and Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997; 389(6651):610-614.
70. Chen DY, Chen YM, Hsieh TY, Hsieh CW, Lin CC and Lan JL. Significant effects of biologic therapy on lipid profiles and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2015; 17(1):52.
71. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D and Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 1994; 94(4):1543-1549.
72. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW and Meigs JB. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008; 93(8):3165-3172.

73. Lo J, Bernstein LE, Canavan B, Torriani M, Jackson MB, Ahima RS and Grinspoon SK. Effects of TNF-alpha neutralization on adipocytokines and skeletal muscle adiposity in the metabolic syndrome. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007; 293(1):E102-109.
74. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS and Grinspoon SK. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; 96(1):E146-150.
75. Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P and Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European heart journal*. 2002; 23(5):376-383.
76. Lubrano V and Balzan S. Consolidated and emerging inflammatory markers in coronary artery disease. *World journal of experimental medicine*. 2015; 5(1):21-32.
77. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S and Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000; 101(18):2149-2153.
78. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI and Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS letters*. 1989; 244(2):487-493.
79. Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A and Perretti M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *Journal of leukocyte biology*. 1998; 63(1):108-116.
80. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Matsukawa A, Morishita R, Kaneda Y and Yokoyama M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002; 22(1):115-120.
81. Balsan GA, Vieira JL, Oliveira AM and Portal VL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2015; 61(1):72-80.
82. Kandasamy AD, Sung MM, Boisvenue JJ, Barr AJ and Dyck JR. Adiponectin gene therapy ameliorates high-fat, high-sucrose diet-induced metabolic perturbations in mice. *Nutrition & diabetes*. 2012; 2:e45.

83. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kubota N, Kaneko K, Kobayashi M, Iwane A, Sasako T, Okazaki Y, Ohsugi M, Takamoto I, Yamashita S, Asahara H, Akira S, Kasuga M, et al. Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell metabolism*. 2011; 13(4):401-412.
84. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H and Matsuzawa Y. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*. 2003; 107(5):671-674.
85. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R and Walsh K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285(9):6153-6160.
86. Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, Kibayashi E, Kobayashi H, Kihara S, Funahashi T, Takata M, Temaru R, Sato A, Yamazaki K, Nakamura N and Kobayashi M. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. *Circulation research*. 2005; 97(12):1245-1252.
87. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T and Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102(11):1296-1301.
88. Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008; 121(2):326-330.
89. Lee BC and Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1842(3):446-462.
90. Wronska A and Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta physiologica*. 2012; 205(2):194-208.
91. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L and Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275(32):24255-24263.
92. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J and Falk W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 2009; 126(2):233-245.

93. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J and Spurlock ME. The c-Jun N-terminal kinase mediates the induction of oxidative stress and insulin resistance by palmitate and toll-like receptor 2 and 4 ligands in 3T3-L1 adipocytes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2009; 41(7):523-530.
94. Melo RC, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM and Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011; 59(5):540-556.
95. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH and Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009; 14(12):1484-1495.
96. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L and Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(45):46835-46842.
97. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M and Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of lipid research*. 2008; 49(7):1562-1568.
98. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K and Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Frontiers in immunology*. 2014; 5:470.
99. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281(36):26602-26614.
100. Surmi BK and Hasty AH. The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascular pharmacology*. 2010; 52(1-2):27-36.
101. Lumeng CN. Innate immune activation in obesity. *Molecular aspects of medicine*. 2013; 34(1):12-29.
102. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ and Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008; 57(12):3239-3246.
103. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M and Tobe K. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*. 2009; 58(11):2574-2582.

104. Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS and Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes*. 2010; 59(5):1171-1181.
105. Ji Y, Sun S, Xia S, Yang L, Li X and Qi L. Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(29):24378-24386.
106. Schaffler A, Scholmerich J and Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends in immunology*. 2007; 28(9):393-399.
107. Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J and Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrine reviews*. 2006; 27(5):449-467.
108. Kanczkowski W, Ziegler CG, Zacharowski K and Bornstein SR. Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15(1):54-60.
109. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H and Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116(11):3015-3025.
110. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG and Olefsky JM. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282(48):35279-35292.
111. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA and Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007; 56(8):1986-1998.
112. Saberi M, Woods NB, de Luca C, Schenk S, Lu JC, Bandyopadhyay G, Verma IM and Olefsky JM. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell metabolism*. 2009; 10(5):419-429.
113. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y and Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007; 27(1):84-91.

114. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM and Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010; 142(5):687-698.
115. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB and Saad MJ. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *The Journal of endocrinology*. 2008; 199(3):399-406.
116. Kuo LH, Tsai PJ, Jiang MJ, Chuang YL, Yu L, Lai KT and Tsai YS. Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia*. 2011; 54(1):168-179.
117. Himes RW and Smith CW. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010; 24(3):731-739.
118. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, Hirabara SM, Castoldi A, Vieira P, Camara NO, Curi R, Carvalheira JB and Saad MJ. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology*. 2011; 9(12):e1001212.
119. McGilvray ID, Serghides L, Kapus A, Rotstein OD and Kain KC. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. 2000; 96(9):3231-3240.
120. Christiaens V, Van Hul M, Lijnen HR and Scroyen I. CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2012; 1820(7):949-956.
121. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE and Febbraio M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovascular research*. 2011; 89(3):604-613.
122. Silverstein RL and Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling*. 2009; 2(72):re3.
123. Hajri T, Han XX, Bonen A and Abumrad NA. Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice. *The Journal of clinical investigation*. 2002; 109(10):1381-1389.
124. Nicholls HT, Kowalski G, Kennedy DJ, Risis S, Zaffino LA, Watson N, Kanellakis P, Watt MJ, Bobik A, Bonen A, Febbraio M, Lancaster GI and Febbraio MA. Hematopoietic cell-restricted deletion of CD36 reduces high-fat diet-induced macrophage infiltration and improves insulin signaling in adipose tissue. *Diabetes*. 2011; 60(4):1100-1110.

125. Moore KJ and Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; 26(8):1702-1711.
126. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K and Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 105(8):1049-1056.
127. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD and Freeman MW. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(49):47373-47379.
128. WHO (2010). Chagas Disease (American trypanosomiasis). Factsheet 340.
129. Schmunis GA and Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta tropica*. 2010; 115(1-2):14-21.
130. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB and Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*. 2012; 34(6):753-770.
131. de Souza W, de Carvalho TM and Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology*. 2010; 2010.
132. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D and Gollob KJ. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104 Suppl 1:208-218.
133. Girones N, Cuervo H and Fresno M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2005; 296:89-123.
134. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International journal for parasitology*. 2001; 31(5-6):550-554.
135. dosSantos V.M., daCunha S.F., Teixeiraetal V.P. Frequency of diabetes mellitus and hyperglycemia in chagasic and nonchagasic women. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999; 32 (5), 489-96.
136. Oliveira LC, Juliano Y, Novo NF and Neves MM. Blood glucose and insulin response to intravenous glucose by patients with chronic Chagas' disease and alcoholism. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1993; 26(11):1187-1190.

137. Tanowitz HB, Amole B, Hewlett D and Wittner M. Trypanosoma cruzi infection in diabetic mice. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1988; 82(1):90-93.
138. Combs TP, Nagajyothi, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, Schubert W, Lin Y, Jayabalan DS, Zhao D, Braunstein VL, Landskroner-Eiger S, Cordero A, Factor SM, Weiss LM, Lisanti MP, Tanowitz HB, et al. The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. The Journal of biological chemistry. 2005; 280(25):24085-24094.
139. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Thiruvur N, Weiss LM, Braunstein VL, Albanese C, Teixeira MM, de Almeida CJ, Lisanti MP, Scherer PE and Tanowitz HB. Trypanosoma cruzi infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. Obesity. 2008; 16(9):1992-1997.
140. Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, Nagajyothi F, Scherer PE, Teixeira MM and Tanowitz HB. Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2011; 13(12-13):1002-1005.
141. Maganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C and Fresno M. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for Trypanosoma cruzi internalization and replication in macrophages. Traffic. 2008; 9(8):1299-1315.
142. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT and Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. Journal of immunology. 2001; 167(1):416-423.
143. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A and Bellio M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. Journal of immunology. 2004; 173(9):5688-5696.
144. Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, Norimine J and Brown WC. DNA from protozoan parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. Infection and immunity. 2001; 69(4):2162-2171.
145. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT and Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. Journal of immunology. 2006; 177(6):3515-3519.

146. Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, Golenbock DT and Gazzinelli RT. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology*. 2011; 187(4):1903-1911.
147. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhyaya R, Zhao D, Schwartz GJ, Teixeira MM, Albanese C, Lisanti MP, Chua SC, Jr., Weiss LM, Scherer PE and Tanowitz HB. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J Infect Dis*. 2012; 205(5):830-840.
148. Gazzinelli RT and Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews Immunology*. 2006; 6(12):895-906.
149. Ponce NE, Carrera-Silva EA, Pellegrini AV, Cazorla SI, Malchiodi EL, Lima AP, Gea S and Aoki MP. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2013; 1832(3):485-494.
150. Chan MM, Evans KW, Moore AR and Fong D. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): balance for survival in parasitic infections. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010; 2010:828951.
151. Odegaard JI and Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*. 2013; 339(6116):172-177.
152. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*. 1999; 138(5 Pt 2):S419-420.
153. Cano RC, Hliba E and Rubiolo ER. Creatine kinase and lactate dehydrogenase levels as potential indicators of *Trypanosoma cruzi* infectivity and histotropism in experimental Chagas' disease. *Parasitology research*. 2000; 86(3):244-252.
154. Heinrich PC, Castell JV and Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal*. 1990; 265(3):621-636.
155. Bresnahan KA and Tanumihardjo SA. Undernutrition, the acute phase response to infection, and its effects on micronutrient status indicators. *Advances in nutrition*. 2014; 5(6):702-711.
156. Yang Z and Ming XF. CD36: the common soil for inflammation in obesity and atherosclerosis? *Cardiovascular research*. 2011; 89(3):485-486.
157. Onofrio LI, Arocena AR, Paroli AF, Cabalen ME, Andrada MC, Cano RC and Gea S. *Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing

local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(2):e0003464.

158. Lutz TA and Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Current protocols in pharmacology / editorial board*, SJ Enna. 2012; Chapter 5:Unit5 61.

159. Carrera-Silva EA, Cano RC, Guinazu N, Aoki MP, Pellegrini A and Gea S. TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Molecular immunology*. 2008; 45(13):3580-3588.

160. Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruending AP, dos Reis D, Gomes ML, de Araujo SM, Bahia MT, Magalhaes LK, de Oliveira Guerra JA, Silveira H, Toledo MJ and Vale Barbosa M. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013; 7(2):e2069.

161. Parasuraman S, Raveendran R and Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2010; 1(2):87-93.

162. Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *Journal of clinical pathology*. 1969; 22(2):246.

163. Singh Y, Lakshmy R, Gupta R and Kranthi V. A rapid 3% polyacrylamide slab gel electrophoresis method for high through put screening of LDL phenotype. *Lipids in health and disease*. 2008; 7:47.

164. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lisanti MP and Scherer PE. Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2000; 14(10):1557-1569.

165. Liu J, Hu S, Cui Y, Sun MK, Xie F, Zhang Q and Jin J. Saturated fatty acids up-regulate COX-2 expression in prostate epithelial cells via toll-like receptor 4/NF-kappaB signaling. *Inflammation*. 2014; 37(2):467-477.

166. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72:248-254.

167. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979; 95(2):351-358.

168. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R and Bouloumie A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004; 53(5):1285-1292.

169. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EN, Bozza PT and Pessolani MC. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular microbiology*. 2011; 13(2):259-273.
170. D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC and Bozza PT. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. *J Infect Dis*. 2011; 204(6):951-961.
171. Ishimoto T, Lanaspá MA, Le MT, Garcia GE, Diggle CP, Maclean PS, Jackman MR, Asipu A, Roncal-Jimenez CA, Kosugi T, Rivard CJ, Maruyama S, Rodriguez-Iturbe B, Sanchez-Lozada LG, Bonthron DT, Sautin YY, et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(11):4320-4325.
172. Like AA and Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*. 1976; 193(4251):415-417.
173. Singh B, Sharma B, Jaggi AS and Singh N. Attenuating effect of lisinopril and telmisartan in intracerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease type: possible involvement of PPAR-gamma agonistic property. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2013; 14(2):124-136.
174. Nagajyothi F, Kuliawat R, Kusminski CM, Machado FS, Desruisseaux MS, Zhao D, Schwartz GJ, Huang H, Albanese C, Lisanti MP, Singh R, Li F, Weiss LM, Factor SM, Pessin JE, Scherer PE, et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease. *The American journal of pathology*. 2013; 182(3):886-894.
175. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T and Nagai R. Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation. *Cell metabolism*. 2012; 15(4):518-533.
176. Cucak H, Mayer C, Tonnesen M, Thomsen LH, Grunnet LG and Rosendahl A. Macrophage contact dependent and independent TLR4 mechanisms induce beta-cell dysfunction and apoptosis in a mouse model of type 2 diabetes. *PloS one*. 2014; 9(3):e90685.
177. Rub A, Arish M, Husain SA, Ahmed N and Akhter Y. Host-lipidome as a potential target of protozoan parasites. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2013; 15(10-11):649-660.

178. Loffler T, Flunkert S, Havas D, Santha M, Hutter-Paier B, Steyrer E and Windisch M. Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPs1 mice. *Neurobiology of aging*. 2013; 34(10):2379-2388.
179. Linton MF, Farese RV, Jr., Chiesa G, Grass DS, Chin P, Hammer RE, Hobbs HH and Young SG. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *The Journal of clinical investigation*. 1993; 92(6):3029-3037.
180. Johndrow C, Nelson R, Tanowitz H, Weiss LM and Nagajyothi F. Trypanosoma cruzi infection results in an increase in intracellular cholesterol. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2014; 16(4):337-344.
181. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB and Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(29):10679-10684.
182. Nagajyothi F, Zhao D, Machado FS, Weiss LM, Schwartz GJ, Desruisseaux MS, Zhao Y, Factor SM, Huang H, Albanese C, Teixeira MM, Scherer PE, Chua SC, Jr. and Tanowitz HB. Crucial role of the central leptin receptor in murine Trypanosoma cruzi (Brazil strain) infection. *The Journal of infectious diseases*. 2010; 202(7):1104-1113.
183. Truyens C, Torrico F, Angelo-Barrios A, Lucas R, Heremans H, De Baetselier P and Carlier Y. The cachexia associated with Trypanosoma cruzi acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. *Parasite immunology*. 1995; 17(11):561-568.
184. Smyth MJ, Sparks RL and Wharton W. Proadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *Journal of cell science*. 1993; 106 (Pt 1):1-9.
185. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL and Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes*. 2001; 50(8):1771-1777.
186. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR and Bozza PT. PPARgamma Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR research*. 2012; 2012:383829.
187. Nagajyothi F, Weiss LM, Zhao D, Koba W, Jelicks LA, Cui MH, Factor SM, Scherer PE and Tanowitz HB. High fat diet modulates Trypanosoma cruzi infection associated myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014; 8(10):e3118.

188. Hovsepian E, Penas F, Mirkin GA and Goren NB. Role of PPARs in Trypanosoma cruzi Infection: Implications for Chagas Disease Therapy. PPAR research. 2012; 2012:528435.