



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia

Núbia Morais Rodrigues

**EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS NA ATIVAÇÃO
DE MACRÓFAGOS MURINOS**

BELO HORIZONTE

MARÇO DE 2017



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NÚBIA MORAIS RODRIGUES. Aos sete dias do mês de março de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Efeitos de ácidos graxos na ativação de macrófagos murinos"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli Co-Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de março de 2017.


 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)


 Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (UFMG)


 Dra. Tatiani Uceli Maioli Co-Orientadora (UFMG)


 Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)


 Profª Lêda Quércia Vieiro
 Coordenadora do Curso de Pós Gradua
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
IMUNOLOGIA

**EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS NA ATIVAÇÃO
DE MACRÓFAGOS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de mestre.

Mestranda: Núbia Moraes Rodrigues

Orientadora: Prof^a.: Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Prof^a.: Tatiani Uceli Maioli

BELO HORIZONTE

MARÇO DE 2017

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pela alfabetização mais que especial, pelas histórias contadas, pelo amor, conhecimentos e educação que escola nenhuma poderia me oferecer.

Ao Carlos, parceiro na vida, amigo, minha mão direita desde o princípio do mestrado, principal ajuda em quase todos os resultados que obtive;

Às minhas orientadoras: Tati em especial, por me orientar e apoiar tanto em todos os passos que dei e por sempre me instruir a como crescer cientificamente. À Ana, por me acolher no laboratório, por estimular o crescimento científico crítico em seus alunos e nos dar as bases da imunologia.

Aos colaboradores, sem eles esse trabalho seria incompleto: À Thaís que me deu suporte técnico para iniciar os experimentos e muitas ideias; à Juliana, me acompanhou nas diversas citometrias, aliviando a pressão do que à princípio parecia ser uma técnica tão complicada. Samara e Ana Lúcia por me darem a possibilidade de realização do ensaio de qPCR. Santuza pela colaboração com os parasitos. À Simone Generoso juntamente com a Tati, que me acolheram no mundo da ciência.

À minha família e amigos fora do ambiente acadêmico, tão compreensivos com as várias ausências neste período de estudo e pesquisa.

Aos demais amigos e colegas do LIB que sempre foram abertos à discussões científicas, pela amizade e apoio, em especial o Mauro, Maria Cecília, César, Caixeta, Dantas, Luisa, Lícia, Sarah e Mariana.

À Daniela Reis, técnica do centro de citometria da UFMG, uma das pessoas mais solícitas que conheci nesse trajeto e que ajudou imensamente para que parte importante deste trabalho acontecesse. Aos demais técnicos Elimar, Eneida, Ildinha, Hermes e Gislene, minha gratidão.

Aos colegas e professores de laboratórios amigos, sempre solícitos: Professora Patiu, Laboratório de genética e genômica molecular de tripanossomatídeos (da professora Santuza) e especialmente à equipe do Laboratório LAGI (da professora Leda).

Ao Orlando e Estevão, secretários da pós-graduação do Departamento de Imunologia e Bioquímica, pelo carinho, atenção e eficiência.

Às funcionárias Carminha e Eliane, como é bom vê-las por perto.

Aos laboratórios multiusuários e respectivos técnicos.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

I. SUMÁRIO

I. SUMÁRIO.....	i
II. LISTA DE ABREVIATURAS	iii
III. LISTA DE FIGURAS	v
IV. LISTA DE TABELAS.....	vi
1. RESUMO E ABSTRACT	1
1.1. Resumo	1
1.2. Abstract.....	2
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. Macrófagos: função e origem	3
2.2. Parâmetros importantes no contexto de ativação de macrófagos	5
2.3. Os ácidos graxos poli-insaturados e a sua importância na função do macrófago	8
2.4. Família de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3	9
2.5. Família de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6	11
2.6. Família de ácidos graxos poli-insaturados isômeros de CLA	12
2.7. Participação dos lipídios no contexto de infecção	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral:	16
3.2. Objetivos específicos:	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Aquisição e diluição dos lipídios	17
4.2. Obtenção de macrófagos e quantificação	17
4.3. Cultura de células	18
4.4. Teste de viabilidade de células com ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	18
4.5. Análise morfológica.....	19
4.6. Ensaio de fagocitose de esferas inertes fluorescentes	19
4.7. Dosagem indireta de óxido nítrico (dosagem de nitrito – Reação de Greiss) .	20
4.8. PCR em tempo real (RT-PCR)	20
4.9. Ensaio de atividade indireta de arginase.....	22
4.10. Dosagem de citocinas por ELISA	22
4.11. Citometria de fluxo.....	23

4.12. Infecção dos macrófagos com <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Efeitos da suplementação <i>in vitro</i> com ácidos graxos poli-insaturados em aspectos gerais de macrófagos	27
5.2. Influência da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados na infecção <i>in vitro</i> de macrófagos com <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
6. DISCUSSÃO	46
6.1. O modelo deste estudo.....	46
6.2. Ômega 3 e ativação de macrófagos	47
6.3. Efeitos do ômega 6 em macrófagos.....	50
6.4. Efeitos do CLA em cultura de macrófagos	52
6.5. Influência dos lipídios na relação parasito-hospedeiro.....	53
7. CONCLUSÕES	56
8. PERSPECTIVAS	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

II. LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico
AP1: Preoteína ativadora 1
BSA: Albumina do soro bovino
CCL1B: Ligante do motivo 'C-C'
CD11b: Cluster differentiation/ Integrin alpha M
CD124: Cluster Differentiation 124/ Receptor de IL-4
CD206: Cluster differentiation/ Receptor de manose
CD43: Cluster differentiation 43/ Sialoforina
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CLA: Ácido linoleico conjugado
COX: Ciclooxygenase
DHA: Ácido docosahexaenoico
DMEM: Meio Dulbeco modificado
DMSO: Dimetilsulfóxido
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA: Ácido eicosapentaenoico
FC: Fragmento cristalizável do anticorpo
FIZZ1: Found in inflammatory zone 1
FMO: Fluorescence minus one
GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC: Glicocorticóides
GM-CSF: Factor estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄: Ácido fosfórico
HCl: Ácido clorídrico
HLA: Antígeno leucocitário humano
IC: Complexo immune
ICAM: Molécula de adesão celular intracelular
IFN- γ : Interferon gama
IL-10: Interleucina 10
IL-13: Interleucina 13
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
IRF: Fatores de regulação do interferon
JAK: Jannus quinase
LA: Ácido linoleico
LNA: Ácido α -linolênico
LPS: Lipopolissacarídeo

LTB: Leucotrieno B
M(IFN- γ + LPS): Macrófago do tipo estimulado com IFN- γ e LPS
M(IFN- γ): Macrófago do tipo estimulado com IFN- γ
M(IL-4): Macrófago do tipo estimulado com IL-4
M1: Macrófago tipo 1
M2: Macrófago tipo 2
MHC: Complexo humano de histocompatibilidade
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro
MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NF κ B: Fator nuclear kappa-B
NO: Óxido nítrico
OPD: o-fenilenodiamina dihidroclorato
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico
PBS: Salina tamponada com fosfato
PCR: Reação de cadeia da polimerase
PGE: Prostaglandina E
PPAR: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PRR: Receptores de reconhecimento de padrões
PUFAs: Ácidos graxos poli-insaturados
RNA: Ácido ribonucleico
SDS: Dodecil sulfato de sódio
STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAM: Macrófagos associados a tumores
TGF- β : Fator de crescimento tumoral beta
Th1: Linfócito T auxiliador 1
Th2: Linfócito T auxiliador 2
TLR: *Toll like receptor* (receptor do tipo toll)
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TXA: Tromboxano A
VCAM: Molécula de adesão celular vascular
 Ω -3: Ômega 3
 Ω -6: Ômega 6

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Viabilidade de células após 6 e 72 horas	25
Figura 2: Morfologia de células tratadas com lipídios	27
Figura 3: Capacidade fagocítica de macrófagos suplementados com lipídios	28
Figura 4: Produção de NO por macrófagos suplementados com lipídios e estimulados com citocinas	30
Figura 5: Expressão de mRNA para iNOS e FIZZ1 em macrófagos suplementados <i>in vitro</i> com lipídios	31
Figura 6: Atividade de arginase induzida em macrófagos suplementados com lipídios.....	32
Figura 7: Produção de citocinas em macrófagos tratados com lipídios e posteriormente estimulados	34
Figura 8: Frequência e Intensidade Média de Fluorescência de MHCII em macrófagos tratados apenas com lipídios e macrófagos posteriormente estimulados	35
Figura 9: Frequência de células positivas para CD124 após serem tratadas com lipídios e estimulados ou não com IFN- γ + LPS	36
Figura 10: Frequência de células que expressam CD206 após tratamento com lipídios e estimulados ou não com IFN- γ + LPS	37
Figura 11: Intensidade Média de Fluorescência da expressão de TLR2 por macrófagos após o tratamento com lipídios	38
Figura 12: Infectividade de células por <i>Trypanosoma cruzi</i> em macrófagos tratados com lipídios	40
Figura 13: Produção de óxido nítrico e de citocinas por células infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> após a suplementação com lipídeos	42
Figura 14: Esquema que sintetiza os principais efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados sobre os macrófagos encontrados neste trabalho	43

IV. LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers controle e de interesse	20
Tabela 2: Anticorpos usados para citometria	22
Tabela 3: Médias das produções de citocinas IL10, TNF e IL-6 em macrófagos tratados apenas com lipídios	33
Tabela 4: Percentual de células que eliminaram o parasito após 48 horas de infecção	41
Tabela 5: Variação em vezes na quantidade de parasitos por células infectadas comparando-se entre 3 e 48 horas de infecção	41

1. RESUMO E ABSTRACT

1.1. Resumo

Os macrófagos têm papel essencial na homeostase do organismo. Estão presentes em todos os tecidos e possuem inúmeros fenótipos que são adaptados ao ambiente tecidual. Vários parâmetros e moléculas são utilizados para mensurar a ativação de macrófagos, como morfologia, atividade de arginase e produção de citocinas além da expressão de moléculas de superfície. Nesse contexto, os lipídios poli-insaturados têm se mostrado fundamentais na atividade dessas células, uma vez que são utilizados pelos macrófagos como parte da estrutura de membrana e influenciam a ativação dos macrófagos mediante estimulação ou infecção. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações induzidas pela suplementação *in vitro* com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em macrófagos murinos. Para isso, foram utilizados macrófagos recrutados com tioglicolato a 3% da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6. Após a retirada do lavado peritoneal com PBS, as células foram contadas e plaqueadas em meio completo. Após o tempo de adesão, as células não aderidas foram lavadas e em seguida receberam os PUFAs na concentração de 100µM (EPA e DHA, da família ômega 3, AA, da família ômega 6 e CLA purificados) em meio completo. Após 48 horas de cultivo com os lipídios, ou posterior estimulação com IFN-γ + LPS ou com IL-4 ou infecção com *Trypanosoma cruzi*, as análises foram realizadas. Foi observado que o EPA induziu aumento na aderência das células à placa, aumento na capacidade fagocítica, aumento na frequência de MHCII^{hi}, CD124 e CD206. Nossos resultados demonstraram também que EPA, DHA e AA reduziram a produção de NO em células estimuladas com IFN-γ + LPS e aumentaram a expressão de TLR2. Além disso, AA aumentou a atividade de arginase, enquanto que CLA aumentou mRNA para iNOS. No contexto de infecção, a suplementação com EPA, DHA e AA foi capaz de reduzir o número de parasitas por célula, porém apenas o EPA reduziu o percentual de células infectadas. Podemos concluir que os lipídios foram capazes de modular a ativação dos macrófagos peritoneais, com destaque para o EPA que aumentou a expressão e frequência de células positivas para moléculas de ativação, aumentou o percentual de células capazes de eliminar o *T. cruzi*, e impediu a produção de NO e IL-6 em células estimuladas.

1.2. Abstract

Macrophages play an essential role in the body's homeostasis. They are present in all tissues and have numerous phenotypes that are adapted to the tissue environment. Several parameters and molecules are used to measure the activation of macrophages, such as morphology, activation of arginase, cytokines production and surface molecules expression. In this context, polyunsaturated fatty acids have been shown to be fundamental since they are used by macrophages as part of the membrane structure and have immune activity, influencing the physiology and activation of macrophages during stimulation or infection. Thus, the aim of this work was to evaluate the changes induced by in vitro supplementation with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in murine macrophages. To do this, peritoneal macrophages from C57BL/6 mice recruited with thioglycolate at 3% was used. After removal of the peritoneal lavage with PBS, the cells were counted and plated in complete medium. After the time for adhesion, cells not adhered were washed and then received PUFAs in concentrations of 100 μ M (EPA and DHA, the omega-3 family, AA, omega-6 family and purified CLA). After 48 hours of lipid culture, or subsequent stimulation with IFN- γ + LPS or IL-4 or infection with *Trypanosoma cruzi*, analyzes were performed. We observed that EPA increased adherence, phagocytic capacity, frequency of MHCII^{hi}, CD124⁺ and CD206⁺ positive cells. Our results also showed that EPA, DHA and AA reduced NO production in cells stimulated with IFN- γ + LPS and also increased expression of TLR2. In addition, AA increased arginase activity, whereas CLA increased mRNA for iNOS. In the context of infection, EPA, DHA and AA were able to reduce the number of parasites per cell, but only EPA reduced the percentage of infected cells. In conclusion the lipids were able to modulate macrophage activation, and EPA was the lipid which had more impact in the activation of peritoneal macrophages by increasing the expression and frequency of cells positives to activation molecules, impaired the production of NO and IL-6 in macrophages that were stimulated and enhanced the number of cells capable of eliminate the *T. cruzi* amastigots.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Macrófagos: função e origem

Os macrófagos são células classificadas como pertencentes ao sistema imune inato e, na vida adulta, são derivados de precursores produzidos na medula óssea, os monócitos. Essas células fagocíticas mononucleares possuem, como atividade principal, a fagocitose e atuam tanto na imunidade inata quanto adquirida (Abbas *et al.*, 2015).

Inicialmente os macrófagos foram descritos por Ilya Metchnikoff (premiado com o Nobel de 1908) como sendo células fagocíticas capazes de proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores (Tauber, 2003). Sendo uma classe celular que constitui a primeira linha de defesa do organismo com relação aos microrganismos, cuja função primária é identificar, fagocitar e evitar a proliferação de dos mesmos. Os macrófagos também contribuem para a homeostase do organismo ao fagocitarem microrganismos e células mortas do hospedeiro como parte do processo de limpeza após uma infecção ou resolução de inflamação tecidual (Livro: Abbas *et al.*, 2015).

Nos anos 60, van Furth propôs que os macrófagos residentes se originavam de monócitos circulantes (Van Furth e Cohn, 1968). Porém, estudos posteriores demonstram que os macrófagos residentes surgem em outros tecidos ainda no estágio embrionário, originando-se do saco vitelínico (Epelman *et al.*, 2014) e fígado fetal, antes mesmo do surgimento de células tronco hematopoiéticas (Guilliams *et al.*, 2013; Ginhoux e Guilliams, 2016). Outros estudos ainda mostraram que os macrófagos residentes são capazes de se auto-renovarem independentemente dos monócitos circulantes (Hashimoto *et al.*, 2013; Yona *et al.*, 2013; Epelman *et al.*, 2014; Perdiguero e Geissmann, 2016).

Dentro da corrente sanguínea, os monócitos se dividem em “inflamatórios” ou “clássicos” e “anti-inflamatórios” ou “não-clássicos”. Os monócitos inflamatórios são caracterizados por alta expressão de Ly6C e baixa expressão de CD43 e por migrarem rapidamente da corrente sanguínea para sítios inflamatórios. Estes se diferenciam em macrófagos inflamatórios no tecido. Em contrapartida, os monócitos anti-inflamatórios são caracterizados pela baixa expressão de Ly6C e alta expressão

de CD43 dando origem a algumas classes de células dendríticas e se diferenciando em macrófagos residentes (Revisado por: Ziegler-Heitbrock, 2014). Ressalta-se que já é estabelecido que os monócitos inflamatórios Ly6C⁺ em estado de repouso são os precursores de monócitos Ly6C⁻ no sangue (Yona *et al.*, 2013).

Ao chegarem nos tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos (Gordon e Taylor, 2005) e adquirem fenótipos específicos requeridos pelo ambiente (Lavin *et al.*, 2014). Por exemplo, as células de Kupffer no fígado, os osteoclastos nos ossos, a micróglia no sistema nervoso e as células alveolares no pulmão. (Mosser e Edwards, 2008). Os macrófagos estão presentes na maioria dos tecidos, e não desempenham apenas a função para a qual foram primeiramente descritos, a de fagocitose, mas são essenciais na homeostase tecidual dos microambientes, contribuindo com a produção fatores de crescimento, citocinas (Pollard, 2009), mediadores lipídios (Heller *et al.*, 2003), entre outros.

Ao se discutir função e ativação de macrófagos, torna-se necessário contextualizar a discussão sobre a sua polarização, uma vez que a quantidade de termos tem expandido. Como consequência, a compreensão dos fenótipos por nomes genéricos tem se tornado difícil devido à falta de unanimidade nos parâmetros avaliados em cada estudo e nas classificações desses macrófagos.

Inicialmente, em 1986, com a descoberta das respostas produtoras de IFN- γ ou de IL-4 e IL-13, definiu-se as resposta dirigidas por linfócitos, e foram nomeadas de Th1 e Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). A origem da classificação da ativação de macrófagos, especialmente a classificação de “macrófagos alternativamente ativados” veio em 1992, com a descrição de alguns efeitos da estimulação de macrófago por IL-4 (Stein *et al.*, 1992).

Os macrófagos M1 seriam os macrófagos pró-inflamatórios, ou classicamente ativados, estimulados pela resposta das células Th1. Geralmente esses macrófagos recebem estímulos pró-inflamatórios representados pela citocina IFN- γ e, como consequência, produzem citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1- β e IL-6. Já os macrófagos alternativamente ativados, ou resolutivos, inicialmente seriam os macrófagos estimulados por citocinas produzidas pela resposta Th2, como a IL-4 e IL-13 e produzem como resposta citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . Esses macrófagos também possuem aumento na expressão de receptor de manose (CD206) e de MHCII (Gordon, 2003; Gordon e Martinez, 2010). Porém, com o

passar do tempo, mais subtipos de macrófagos M2 surgiram, demonstrando a existência de pelo menos 3 classes de M2, sendo a ativação dos macrófagos M2a estimulada por IL-4 e IL-13; a ativação de M2b por complexos imunes e LPS; a ativação de M2c por glicocorticoides e TGF- β , e a ativação de M2d por IL-6 e adenosinas (Rószler, 2015).

Recentemente, devido ao crescente número de publicações abrangendo diversas terminologias que classificam a ativação de macrófagos, alguns dos principais pesquisadores ocupados com o estudo dessas células se reuniram para unificar e rever as terminologias usadas. Segundo essa nova diretriz, os pesquisadores sugerem que termos que podem gerar confusão como “macrófagos reguladores” sejam evitados e, em troca, foi proposto que os macrófagos sejam classificados pelos estímulos aplicados (Murray *et al.*, 2014). No caso de macrófagos M2, estes seriam: estimulado por IL-4 (IL-4), complexos imunes (Ic), IL-10 (IL-10), glicocorticoides e TGF- β (GC + TGF- β) ou glicocorticoides (GC).

Para ilustrar melhor a diversidade de ativação de macrófagos, David Mosser e seus colaboradores em alguns dos seus estudos reúnem achados que mostram que a polarização seria como um espectro contínuo que abrange várias subformas de ativação de macrófagos que vão além dos clássicos M1 e M2 (Mosser e Edwards, 2008; Fleming e Mosser, 2011). Entre vários exemplos, podemos citar os macrófagos que misturam perfis de ativação, como os TAMs (macrófagos associados à tumores) (Noy e Pollard, 2014) e os macrófagos sub-epiteliais no intestino (Smythies *et al.*, 2005; Platt e Mowat, 2008). Sendo assim, tentar enquadrar os macrófagos em apenas um ou outro tipo restrito seria uma forma muito estreita de descrever e classificar essas células dado que a atividade de macrófagos parece ser extremamente plástica e variável.

2.2. Parâmetros importantes no contexto de ativação de macrófagos

Várias moléculas de superfície, citocinas e enzimas são associados aos diferentes contextos de ativação dos macrófagos, são elas:

MHC II (complexo de histocompatibilidade II): Esta molécula é necessária à apresentação de antígenos de origem extracelular tem aumento na sua expressão

em membrana de macrófagos que foram estimulados tanto com IL-4 quanto com IFN- γ (Cao *et al.*, 1989; Gerrard *et al.*, 1990). Enquanto que as três subunidades HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ de PBMC de humanos são expressas quando os macrófagos são estimulados com IFN- γ , apenas as subunidades HLA-DR e HLA-DP são expressas com IL-4 (Gerrard *et al.*, 1990).

Arginase: A arginina tem múltiplos destinos metabólicos, o que a torna um dos aminoácidos mais versáteis do organismo (Morris, 2007). A arginina dentro das células pode ser alvo das enzimas iNOS e arginase (Hey *et al.*, 1995). Além de metabolicamente interconvertível com os aminoácidos prolina e glutamato, ela serve também, por exemplo, como precursor para a síntese de proteínas, óxido nítrico, creatina, poliaminas e ureia. O óxido nítrico é um produto da via da enzima iNOS enquanto que as prolinas são produtos da via da arginase. Devido ao fato de a ornitina produzida pela arginase também servir como precursor para a síntese de prolina, que auxilia na produção de colágeno, a via da arginase está relacionada com a cicatrização de feridas, remodelamento tecidual e fibrose (Morris, 2007).

iNOS: A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é responsável pela produção de óxido nítrico em algumas populações celulares específicas, como endotélios, hepatócitos, monócitos, mastócitos, macrófagos e células musculares lisas. Essa enzima é capaz de gerar óxido nítrico sem influência da concentração intracelular de cálcio (revisado por: Aktan, 2004). Os fatores de transcrição como NF- κ B (fator nuclear kappa B) e a AP-1 (proteína ativadora-1) são responsáveis por mediar a expressão de iNOS e outros genes como a COX-2 (ciclooxigenase-2), VCAM-1 (Molécula-1 celular de adesão vascular), ICAM-1 (Molécula-1 celular de adesão intercelular) e nas respostas inflamatórias do sistema imune (Xie *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2001). A combinação de citocinas inflamatórias ou LPS e IFN- γ induzem a expressão de iNOS de forma sinérgica. A exposição das células ao INF- γ ativa as enzimas JAK1 e JAK2 (janus quinases), que fosforilam e ativam STAT-1. Ativado, o STAT-1 é translocado para o núcleo, onde aumenta os níveis do fator de transcrição IRF-1 e induz a transcrição do gene iNOS nas células murinas, como os macrófagos (revisado por Rao, 2000). A expressão de iNOS está relacionada com os PPARs, os quais podem antagonizar a atividade dos fatores de transcrição que aumentam a expressão de iNOS, como AP-1, STAT e NF κ B (Ricote *et al.*,

1998). O TGF- β também é capaz de inibir a indução de iNOS porque ele desestabiliza o mRNA dessa enzima (Vodovotz *et al.*, 1993; Perrella *et al.*, 1994)

NO: O óxido nítrico (NO) tem diversos papéis no organismo, além de seus papéis imunológicos. Essa molécula é um sinalizador inter e intracelular e exerce papéis importantes no sistema nervoso, no fígado e no tecido endotelial. No contexto de ativação de macrófagos, o NO é um produto da ativação dessa célula por citocinas inflamatórias e patógenos, ou ambos, e é derivado do aminoácido L-arginina. Essa molécula é formada pelas enzimas óxido nítrico sintases e possui papel tumoricida e bactericida *in vitro* e *in vivo*. Já foi demonstrado que a indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a produção resultante de NO são importantes na resposta inflamatória sistêmica, como no contexto da sepse (Revisto por: Moncada e Higgs, 1991; Nathan, 1992; Bogdan, 2001; Aktan, 2004).

CD206 (receptor de manose tipo C1): O CD206 é uma glicoproteína transmembrana que liga e internaliza glicoproteínas e ligantes de colágenos. Está presente em vários macrófagos residentes. Sua expressão é amplificada pelo estímulo com as citocinas IL-4 e IL-13, GM-CSF (fator de estímulo de colônias de granulócitos macrófagos), infecções intestinais helmínticas, TGF- β e outras vias dependentes dos sinais IL-4 ou IL-13 (Revisto por Rószler, 2015). Um dos importantes papéis desse receptor é retirar moléculas inflamatórias do sangue (Lee *et al.*, 2002). Entretanto, macrófagos que expressam CD206 podem possuir efeito fibrótico desfavorável ao organismo, uma vez que promovem o crescimento de fibroblastos através da expressão de TGF- β e da quimiocina CCL18 (ligante do motivo C-C) (Bellón *et al.*, 2011).

CD124: O CD124 é um receptor da citocina IL-4. É encontrado em vários tipos celulares, tecido hematopoiético, endotelial, epitelial, músculo, fibroblastos, hepatócitos e tecidos cerebrais (Nelms *et al.*, 1999). Em macrófagos, esse receptor está presente principalmente em células que estão relacionadas com a resposta linfocitária Th2 (Ferrante *et al.*, 2013).

FIZZ1: (do inglês: *found in inflammatory zone*), também conhecida como RELM α é uma proteína do tipo resistina que é marcadamente super expressa nos pulmões durante inflamação alérgica (Holcomb *et al.*, 2000; Stepan *et al.*, 2001). Essa proteína tem sido encontrada em macrófagos alternativamente ativados, pela

via IL-4, mas sua função exata ainda não tem sido completamente elucidada (Raes *et al.*, 2002).

TLR2 (do inglês: *toll like receptor*): os TLRs são receptores de reconhecimento de padrões, que possuem uma função única e essencial na imunidade. Os TLRs compreendem uma família do tipo I de receptores transmembrana que são caracterizados por um domínio extracelular de repetições ricas em leucina e um domínio intracelular do receptor de IL-1/Toll (Medzhitov, 2001). A interação do TLR com o ligante desencadeia nas proteínas adaptadoras intracelulares MyD88 ou TRIF a ativação da resposta aguda inflamatória em macrófagos que leva à expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas anti-microbianas (Papadopoulos *et al.*, 2013). O TLR2 é receptor para peptidoglicanos, lipoproteínas, algumas classes de LPS, GPI (de *T. cruzi*) e zimosan (Medzhitov, 2001).

Capacidade Fagocítica: a fagocitose dos patógenos pelos macrófagos inicia a resposta imune inata e, em troca, orchestra a resposta imune adaptativa. Vários são os receptores usados para reconhecimento de padrões de patógenos que são necessários para a fagocitose. A internalização de uma partícula é iniciada pela interação específica com o receptor da superfície do fagócito com ligantes na superfície da partícula. Essa ligação induz a polimerização da actina, rearranjo do citoesqueleto no local da ingestão e internalização da partícula por esse mecanismo baseado em actina (Revisto por: Aderem e Underhill, 1999). Os macrófagos chamados de M2 se destacam nesse contexto, pois possuem alta capacidade fagocítica graças à uma grande variedade de receptores *scavengers* que possuem (Rószler, 2015).

2.3. Os ácidos gráxos poli-insaturados e a sua importância na função do macrófago

Os lipídios são um grupo heterogêneo de compostos caracterizados por sua insolubilidade em água. Estes são constituídos principalmente de átomos de carbono e hidrogênio, possuindo um pequeno número de grupos funcionais contendo oxigênio. Devido à sua estrutura molecular específica, têm propriedades

anfipáticas: cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica, estrutura esta que afeta a sua disposição dentro da membrana celular (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015).

Dentro do grupo dos lipídios encontram-se os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Os PUFAs são ácidos graxos que contém duas ou mais duplas ligações e dentre eles se destacam as famílias ômega 3 e ômega 6. Ambas as famílias de ácidos graxos são consideradas essenciais pois não são produzidas pela maioria dos mamíferos, entre eles os humanos, sendo, então, necessário o seu aporte pela dieta. Uma vez dentro da célula, esses ácidos graxos podem ser alongados e metabolizados em eicosanoides (Schmitz e Ecker, 2008).

Devido à grande quantidade de lipídios pertencentes à essas famílias, é necessário entender a forma como são classificados. Resumidamente, a ordem de numeração dos átomos de carbono nos ácidos graxos começa com o grupo carboxila. Nesse grupo, o carbono da carboxila (COOH) é definido como C1, e a numeração adicional dos próximos carbonos segue como: C2, C3, etc. O primeiro carbono após a carboxila, C2, pode ser definido pela letra grega alfa – α , o segundo, C3 por β e assim por diante. O átomo de carbono mais afastado do grupo carboxila é definido pela letra ômega ω . Quando começa-se a contar do carbono ω até a primeira ligação dupla entre átomos de carbono na cadeia hidrocarbonada ($-C=C-$), pode-se determinar a afiliação desse ácido à série de ácidos graxos ômega, ômega-3, ômega-6 ou ômega-9, por exemplo. Sendo assim, a estrutura química dos ácidos graxos é apresentada da seguinte forma: o número de átomos de carbono, o número de ligações duplas e o grupo ω . O ácido docosahexaenóico, por exemplo, é definido como C22:6 ω -3, o que significa que possui 22 átomos de carbono e seis duplas ligações e pertence ao grupo de ômega-3 (possui a primeira ligação dupla no terceiro átomo de carbono, quando contamos a partir do carbono ω) (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015).

2.4. Família de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3

A família de PUFAs ômega 3 pode ser representada principalmente pelo ácido graxo α -linolênico (LNA). Quando metabolizado, origina dentre outros metabólitos, o EPA (ácido eicosapentaenóico) e o DHA (ácido docosahexaenóico). Essa metabolização é dada pelo aumento do comprimento da cadeia de

hidrocarboneto e pela adição de ligações duplas. Há uma competição entre ômega 3 e 6 pelas enzimas de dessaturação e alongação, entretanto as enzimas possuem maior afinidade com lipídios ômega 3. Enquanto LNA é encontrado principalmente em vegetais, EPA e DHA são naturalmente encontrados em peixes, principalmente os mais gordurosos (Revisto por: Simopoulos, 1991).

Os eicosanoides são mediadores derivados de lipídios com ação parácrina, ou seja, agem apenas nas células vizinhas, e podem ser gerados em quase todos os tecidos. Eles geralmente tem ação apenas local devido à sua meia-vida curta e inativação enzimática rápida. Os lipídios ômega 3 originam principalmente as séries 3 e 5 de eicosanoides, como tromboxanos₃ (TXA₃), prostaglandinas₃ (PGE₃), leucotrienos₅ (LTB₅, LTE₅), entre outros (Heller *et al.*, 2003).

As primeiras evidências do papel dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 vieram de observações epidemiológicas de baixa incidência de doenças autoimunes e inflamatórias em uma população de esquimós que vivia na Dinamarca, com elevado consumo de peixes na sua dieta (Kromann e Green, 1980). Desde então, os efeitos imunomoduladores dos PUFA da família ômega 3 tem sido intensamente estudados. Em humanos e animais, já existe um grande número de estudos que encontraram efeitos anti-inflamatórios (Beguin *et al.*, 2013; De Vasconcelos Generoso *et al.*, 2015), antioxidantes (Hajianfar *et al.*, 2013), antitumorais (Corsetto *et al.*, 2011) e principalmente efeitos na proteção do sistema cardiovascular (Sethi *et al.*, 2013) exercidos pelos lipídios ômega 3.

Nos macrófagos, vários estudos tem sido realizados que comprovam o papel imunomodulador de lipídios. A composição lipídica dos macrófagos é influenciada pelo meio em que se encontram e pode afetar diretamente a atividade dessas células e o desfecho de um evento inflamatório (Calder *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 2012; Schoeniger *et al.*, 2016; Schumann, 2016).

Schumann e colaboradores relataram que um dos primeiros efeitos da suplementação com ômega 3 é a sua incorporação na membrana plasmática dos macrófagos com consequente aumento dos mediadores lipídicos (Schumann *et al.*, 2011). Com a incorporação do ômega 3 e competição pelas enzimas dessaturases, os metabólitos da família ômega 6 são, por consequência, diminuídos (Sargi *et al.*, 2013) e os metabólitos derivados dos lipídios ômega 3 aumentam (Seki *et al.*, 2009). A fluidez da membrana e a capacidade de fagocitose também são alteradas

(Schumann, 2016). Em relação à resposta da célula a estímulos, também já é mostrado que os lipídios EPA e DHA conseguem suprimir a ativação de NFκB via ativação por LPS e conseqüentemente reduzem a produção de citocinas inflamatórias e aumentam a produção de IL-10 (Skuladottir *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2012).

2.5. Família de ácidos graxos poli-insaturados ômega 6

A segunda classe de ácidos graxos essenciais é composta pelos lipídios ômega 6, representada pelo ácido linoleico (LA). Assim como o ômega 3, ao ser metabolizado, esse lipídio gera ácidos graxos de cadeia longa com 20 e 22 átomos de carbono, com mais ligações duplas, como o ácido araquidônico (AA) (Simopoulos, 1991). Nas dietas ocidentais, o ácido linoleico é a fonte primária de PUFA, seguido pelo ácido linolênico, com as maiores fontes de ômega 6 sendo óleos vegetais como o óleo de milho (Schmitz e Ecker, 2008)

Os eicosanoides oriundos do AA são metabolizados pelas cicloxigenase, lipoxigenase e citocromo P450 (Buczynski *et al.*, 2009) e são gerados, entre outros metabólitos, os leucotrienos de classe 4, tromboxanos e prostaglandinas de classe 2 (Heller *et al.*, 2003). Esses mediadores lipídicos possuem efeitos mais potentes comparados com os metabólitos da família ômega 3, porém os lipídios dessa família exercem efeitos diferentes aos mediados pela família ômega 6 (Heller *et al.*, 2003).

Na membrana das células, o ômega 6 costuma ser o precursor preferencial dos eicosanoides, uma vez que esse ácido graxo é consideravelmente mais abundante (Schmitz e Ecker, 2008). Apenas 5 minutos após a sua adição no meio de cultivo de células, já são notados efeitos modulatórios em fatores de transcrição (Hughes-Fulford *et al.*, 2006). Na literatura, em contraste ao papel mais anti-inflamatório dos ácidos graxos ômega 3, tem sido relatado um papel mais pró-inflamatório dos lipídios ômega 6 e seus metabólitos (Schmitz e Ecker, 2008). O aumento na proporção de ingestão de ômega 6:3 tem mostrado relação até mesmo com o surgimento de câncer de próstata (Simopoulos, 1999).

Já em relação ao comportamento da membrana, assim como para o ômega 3, a fluidez e capacidade fagocítica dos macrófagos também são influenciadas por

ômega 6 (Schroit e Gallily, 1979; Schumann, 2016). A produção de citocinas também tem se mostrado passível de modulação, com aumento na produção de citocinas com maior perfil pró-inflamatório (Patterson *et al.*, 2012). Porém, ao contrário dos lipídios EPA e DHA, há estudos que mostram que o AA está associado com ativação de NFκB (Camandola *et al.*, 1996) ou com genes regulados pelo NFκB (Hughes-Fulford *et al.*, 2006).

2.6. Família de ácidos graxos poli-insaturados isômeros de CLA

O CLA é o nome genérico utilizado para todas as isomerias posicionais e geométricas do ácido linoléico. O ácido linoléico, ou o cis-9 e cis-12 ácido octadecadienóico, é um ácido graxo de 18 carbonos contendo duas duplas ligações nas posições 9 e 12. O ácido linoléico pode ser convertido a CLA quando reações microbiológicas ou reações químicas deslocam a dupla ligação para formar alternadas ligações duplas e simples, por isso, então, denominados conjugados. As ligações duplas de CLA podem ser nas posições 7,9; 8,10; 9,11; 10,12; ou 11,13 ao longo da cadeia de 18 carbonos (Rainer e Heiss, 2004). Os dois isômeros que possuem atividade biológica são cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 (Pariza *et al.*, 2001).

O CLA, assim como outros PUFAs, é incorporado aos lipídios de membrana da célula, e alguns dos seus efeitos biológicos podem ser devidos à composição e à sua função na membrana celular, assim como nos ácidos graxos ômega 3 e 6. Eles se incorporam de forma muito similar ao ácido linoleico, sem distinção por serem conjugados. Porém a captura dos isômeros de CLA acontece de forma desigual (Subbaiah *et al.*, 2011). Já na membrana, o CLA compete pelas elongases e dessaturases, usadas pelos lipídios ômega 3 e 6 para formar outros lipídios (Bassaganya-Riera *et al.*, 2002).

O CLA é encontrado principalmente nos produtos cárneos ou produzidos por ruminantes como leite e derivados. O leite e outros laticínios são boas fontes de CLA devido à habilidade das bactérias dos ruminantes converterem o ácido linoleico em CLA via uma reação enzimática (Banni, 2002). Uma boa quantidade de CLA é encontrada na carne e leite bovino, sendo estes os dois produtos naturais com a

melhor concentração de CLA com 4 a 6mg por grama de gordura (Wahle *et al.*, 2004).

Estudos revelam íntima relação entre modulação do sistema imune, principalmente dos macrófagos, pelo CLA e a ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) (Yu *et al.*, 2002). A ativação de PPAR- γ induz redução na expressão de citocinas pro-inflamatórias por antagonizar a ação do fator de transcrição NF- κ B (nucleor factor κ B) (Wright *et al.*, 2014). Além disso, também já é descrita a capacidade aumentada do CLA de polarizar macrófagos para um perfil “anti-inflamatório” (Szanto, Balint *et al.* 2010) assim como seu papel ateroprotetor (De Gaetano *et al.*, 2015). Esse lipídio também é capaz de suprimir a migração de monócitos e macrófagos (McClelland *et al.*, 2010).

2.7. Participação dos lipídios no contexto de infecção

Como já descrito, um dos principais papéis dos macrófagos, além da homeostase tecidual, é o reconhecimento, fagocitose e eliminação de parasitos. Esse papel é exercido principalmente pelo macrófago classicamente ativado ou M (IFN- γ) (Mills *et al.*, 2000). Entretanto, alguns estudos tem mostrado que os macrófagos também podem exercer esses papéis quando estão alternativamente ativados (também chamados M(IL-4) (Wirth *et al.*, 1989; Solbach *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 2011).

Há poucos estudos mostrando como a suplementação com PUFAs pode influenciar na resposta do macrófago à infecção por patógenos intracelulares. No estudo de Bonilla e colaboradores, a suplementação com ômega-3 em macrófagos piorou a infecção pela bactéria *M. tuberculosis* (Bonilla *et al.*, 2010). Já em outro estudo, os macrófagos que receberam PUFAs tiveram mais sucesso em eliminar o fungo *Pseudomonas aeruginosa* (Schoeniger *et al.*, 2016). O aumento ou diminuição de mediadores lipídios derivados de PUFAs também está relacionado com maior ou menor poder de infecção por algumas espécies de parasitos. Isso é mostrado em revisão por Russel e Schearze, que vírus como o Influenza A tiveram maior sucesso com a diminuição de lipoxinas (mediadores derivados de ômega-6), sendo essas capazes de influenciar na diferenciação de macrófagos para o perfil alternativamente ativado de macrófagos, necessário para a resolução da inflamação Já na defesa

contra *M. tuberculosis*, a ausência das lipoxinas foi mais benéfica para controlar a infecção e inflamação. Em infecção *Trypanosoma cruzi*, o aumento de lipoxina foi capaz de diminuir a parasitemia *in vivo* (Russell e Schwarze, 2014).

Nesse contexto de ativação celular e infecção, o protozoário *Trypanosoma cruzi* parece modular o macrófago para inicialmente um perfil classicamente ativado, com mudança posterior para um perfil mais tolerogênico, que resulta em um fenótipo que não se enquadra perfeitamente nos fenótipos clássicos, M1 ou M2 (Zanluqui *et al.*, 2015).

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular obrigatório, agente causador da Doença de Chagas a qual afeta muitos indivíduos, principalmente nas Américas Central e do Sul. Os desfechos da infecção por esse parasito na célula podem ser dois: replicação ou morte pelos mecanismos de defesa celular. A infecção pode se dar após a picada do vetor, que deposita fezes e urina contaminadas próximas ao orifício da picada, por uma transfusão sanguínea, entre outras formas. Já dentro do corpo, o parasito invade as células do local da inoculação, sendo o macrófago uma das primeiras a se infectar (De Souza *et al.*, 2010).

Existem várias formas de endocitose do parasito pela célula, entre elas a fagocitose. Na fagocitose, o macrófago usa diversos receptores, chamados de PRRs (receptores de reconhecimento de padrão), como TLR2 e 4, receptor de manose (CD206), *scavengers* e receptores FC. Esses receptores estimulam a formação de protusões citoplasmáticas que são formadas ao redor do parasito e resultam em completa fagocitose (Barrias *et al.*, 2013).

Nesse contexto, sabendo-se que os lipídios podem modular a ativação de macrófagos e que isso pode alterar vários parâmetros importantes no funcionamento dessas células, decidimos investigar e comparar o efeito dos 4 lipídios poli-insaturados em contextos fisiológicos, de estimulação e de infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Apesar dos achados na literatura, referenciados neste trabalho, vários parâmetros ainda não foram descritos de forma unificada em um mesmo estudo, avaliando e comparando a ação dos principais ácidos graxos poli-insaturados na ativação dos macrófagos e no desfecho de um evento infeccioso em parasita intracelular como o *T. cruzi*.

Os lipídios escolhidos neste trabalho (ácidos eicosapentaenoico, docosahexaenoico e linoleico conjugado) tem sido estudados pelo laboratório de imunobiologia em modelos animais. Os lipídios da família ômega 3 foram previamente utilizados, na forma de óleo de peixe, como tratamento em modelo de mucosite em murinos e foram capazes de prevenir o dano tecidual causado pelo fármaco 5-fluorouracil (indutor de mucosite) (De Vasconcelos Generoso *et al.*, 2015). Já o CLA, foi utilizado em modelo, de doença inflamatória intestinal, onde apresentou papel imunomodulador (Garcia, 2015). Por último, incluímos o AA, que como descrito anteriormente, tem sido mostrado na literatura como um lipídio que produz efeitos antagonistas aos efeitos dos lipídios ômega 3.

Não obstante ter sido ressaltada a importância de se evitar termos deterministas para a ativação e a polarização de macrófagos, neste trabalho utilizamos os termos “classicamente ativado” ou M(IFN- γ + LPS) e “alternativamente ativado” ou M(IL-4) a título apenas de comparação. Acreditamos que a comparação de apenas um dos subtipos de macrófagos seria uma abordagem incompleta, da mesma forma que abordar vários tipos e subtipos de classificações seria desnecessariamente complexo. O objetivo deste trabalho não é classificar ou nomear a ativação de macrófagos, mas é sobretudo vislumbrar as possibilidades de ativação decorrente da suplementação com PUFAs dentro do amplo espectro possível para a ativação dessas células.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar as alterações induzidas pela suplementação *in vitro* com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na ativação de macrófagos murinos.

3.2. Objetivos específicos:

1. Verificar se os macrófagos tratados com PUFAs apresentam alterações relativas à ativação: na capacidade de adesão, na capacidade fagocítica, na expressão de moléculas de superfície celular, na produção de óxido nítrico e de citocinas, na atividade de arginase e na expressão de RNA mensageiro para FIZZ e iNOS;
2. Avaliar se a suplementação *in vitro* com PUFAs altera o comportamento de macrófagos infectados pelo parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aquisição e diluição dos lipídios

Os lipídios usados nesse estudo foram adquiridos na empresa Sigma®. Os ácidos graxos cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico, cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico, ácido linoleico conjugado e ácido araquidônico (isolado em fígado suíno) possuíam pureza maior ou igual a 98%.

Os lipídios foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril e essa solução foi diluída em meio completo estéril, de forma que o estoque lipídico ficou com concentração final de 1000µM com 0,1% de DMSO. Após diluição, os mesmos foram aliquotados e permaneceram estocados à -20°C, livre de luz, como instrui o fabricante.

4.2. Obtenção de macrófagos e quantificação

Os macrófagos utilizados foram provenientes de camundongos machos e fêmeas C57BL/6 com mais de 10 semanas de idade provenientes da colônia do Biotério do Laboratório de Imunobiologia da UFMG ou do CEBIO também da UFMG. Os animais foram mantidos em biotério convencional com barreiras e controle de luz. A comida e água foram ofertadas *ad libitum*. O modelo utilizado no projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal – CETEA/UFMG e o número de protocolo é 63/2016.

Os animais receberam uma injeção de tioglicolato a 3% na cavidade peritoneal. Após 96 horas esses animais foram anestesiados com 0,15 mL de solução (xilasina/ ketamina) e eutanasiados com deslocamento cervical. Preparo da anestesia: (1 mL de salina + 500 µL de Ketamina + 500 µL de Xilasina).

As células recrutadas e residentes foram retiradas por lavagem com injeção de 10mL de salina tamponada com fosfato (PBS) na cavidade peritoneal. Em seguida as células foram sedimentadas por centrifugação (1200rpm por 10min em centrífuga refrigerada a 4°C) e ressuspensas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* completo (DMEM - Gibco®, 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma, St. Louis,

MO), gentamicina (50mg/mL), piruvato de sódio (100mM), aminoácidos não essenciais (10mM), 2-mercaptoetanol (2mM) e bicarbonato de sódio). As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

4.3. Cultura de células

Após ressuspendidos em DMEM, os macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células/mL. Após período de adesão na placa de 4 horas ou *overnight*, os macrófagos foram lavados com meio DMEM incompleto, e em seguida receberam o DMEM completo e os lipídios. As concentrações de lipídios utilizadas foram de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$. Após alguns testes, escolheu-se a concentração de $100 \mu\text{M}$ como a experimental. Em todos os experimentos, as células foram incubadas com os lipídios por 48, 72 ou 96 horas.

4.4. Teste de viabilidade de células com ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células/ml em meio DMEM completo e tratados em placas de cultura de 96 poços com diferentes concentrações dos ácidos graxos (10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$) e estimulados com 1ng/ml de IFN- γ purificado (Peprotech[®]) e 100ng/ml de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*, Sigma[®]). Os macrófagos permaneceram incubados com esses tratamentos por 6 ou 72 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação foi realizado o ensaio com 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT). Após adição de MTT, as placas permaneceram por 4 horas na estufa e em seguida foi adicionado SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, Sigma[®]) 10% em HCl para solubilizar os cristais de formazan. Após incubação *overnight*, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (570 nm). Os ensaios foram realizados em duplicata. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, é um método utilizado na avaliação de toxicidade celular. Essa técnica baseia-se na redução do sal de tetrazólio por enzimas mitocondriais em células viáveis intactas. Uma vez reduzido a cristais de formazan,

o MTT torna-se insolúvel e com coloração púrpura no meio de cultura, sendo possível sua mensuração por meio de espectrofotometria.

4.5. Análise morfológica

Neste protocolo as células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas ou IFN- γ (1ng/ml) e LPS (100ng/ml) por 24 horas. Em seguida, foram capturadas 10 imagens de cada amostra no microscópio digital EVOS FL[®], na objetiva de aumento de 20 vezes. Os macrófagos de um campo das imagens foram classificados com escore de 1 a 4, sendo: 1 células esféricas ou não espalhadas; 2 células pouco espalhadas; 3 células espalhadas, e 4, células muito espalhadas sobre a placa. As médias dos valores foram usadas para representar os grupos. Cada imagem contém uma barra de escala equivalente a 200 μ m.

4.6. Ensaio de fagocitose de esferas inertes fluorescentes

O ensaio de fagocitose foi feito como descrito por Rivollier e colaboradores (2012) (Rivollier et al., 2012). Neste protocolo as células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10ng/ml) por 48 horas ou IFN- γ (1ng/ml) e LPS (100ng/ml) por 24 horas. Após a desaderência da placa, as células foram lavadas com PBS-wash (PBS acrescido de 0,5% de albumina sérica bovina) gelado e marcadas com anticorpo conjugado ao fluorocromo PE-Cy7 anti-F4/80 por meia hora. Em seguida, foram lavadas com PBS-wash e as amostras foram incubadas com esferas inertes fluorescentes (Fluoresbrite Plain Yellow Gold[®] 1- μ m Microspheres (Polysciences Inc[®]) em estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 45 minutos (aproximadamente 50×10^6 esferas inertes fluorescentes para cada 2×10^6 células). Após esse tempo as células foram novamente lavadas com PBS-wash e a leitura foi realizada no citômetro FACSCanto II da BD Biosciences.

4.7. Dosagem indireta de óxido nítrico (dosagem de nitrito – Reação de Griess)

Após cada experimento os sobrenadantes eram armazenados em microtubos de 1,5mL à -20°C. A concentração de nitrito no sobrenadante foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (Green *et al.*, 1981). A reação de Griess acontece pela mistura de 1:1 de soluções contendo 1% de sulfanilamida (50µL) e 0.1% de naftiletilenodiamino-dicloridrato em ácido fosfórico (H₃PO₄) (50µL) a 2,5%. As amostras (50µL do sobrenadante) foram transferidas em duplicatas, para uma placa tipo ELISA de 96 poços. O mesmo volume (50µl) de cada reagente de Griess foi adicionado em cada poço. A curva padrão é feita com diluições seriadas de nitrito em concentrações conhecidas, usado para calcular a quantidade de nitrito presente na amostra. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida por espectrofotômetro com filtro para comprimentos de onda de 540nm. Os valores utilizados para o cálculo da curva padrão de NaNO₂ foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 µM.

4.8. PCR em tempo real (RT-PCR)

Após 48 horas incubadas com os lipídios ou apenas meio completo, as células foram estimuladas por 24 horas com IFN-γ (0,1ng/mL) e LPS (900ng/mL) enquanto as outras permaneceram apenas com lipídios ou sem tratamento. As células aderidas à placa (aproximadamente 2,5x10⁶) foram homogeneizadas e armazenadas em 0,190mL de TRIZOL (Ambion®, Carlsbad, CA, USA). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10min a temperatura entre 15° a 30°C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 100µl de clorofórmio para cada 0,5mL de TRIZOL. Foi realizada agitação em vortex e depois incubação por três minutos à temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 12.000xg por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em fase inferior (de cor rosa), contendo fenol-clorofórmio, fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa que foi transferida para microtubo novo. O RNA foi precipitado com álcool isopropílico (300µL). As amostras foram incubadas por 10min

à temperatura ambiente sendo após centrifugadas a 12.000xg por 10min a 4°C e então formaram-se pequenos *pellets* brancos. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 0,5mL de etanol 75% (diluído em água ultra pura). O tubo foi agitado no vortex para que o sedimento se soltasse do fundo. Então, foi realizada nova centrifugação a 7.500xg por cinco minutos à 4°C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto tempo suficiente para secagem do sedimento que, em seguida, foi diluído em 20µL de água ultra pura. O RNA foi estocado a -72°C. A quantificação do RNA foi realizada no espectrofotômetro DS11 (DeNovix Technologies®, Wilmington, DE, EUA). A leitura do branco foi feita com água ultra pura. O aparelho forneceu a concentração em ng/mL e a razão 260/280 (RNA/ proteínas) e 260/230 (RNA/ álcoois).

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), conforme instruções do fabricante.

Para as reações subseqüentes de amplificação, 1µl da amostra de cDNA foi utilizada. A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada em volume final de 15µL contendo 5µL de SYBER Green Master Mix (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), 0,4µL de primer senso a 5µM, 0,4µL de primer anti-senso a 5µM e 8,2µL de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se termociclador C1000™ Thermal Cycler (Biorad ®). Em resumo, foi feita incubação inicial de um minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, um minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de melting: 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e rampa de subida lenta de temperatura até 95°C. A expressão relativa foi calculada pelo método $-\Delta\Delta CT$. Os dados foram demonstrados como (*fold change*) dos genes alvo em relação ao controle interno do genes GADPH.

Tabela 1: Sequência dos primers controle e de interesse

Gene	Senquências	
	Senso	Anti-senso
Gapdh	5'- AGGAGCGAGACCCCACTAAC- 3'	5' – GTGGTTCACACCCATCACAA- 3'
iNOS	5'- CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC- 3'	5'- GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG- 3'
FIZZ	5'- AATCCAGCTAACTATCCCTCCA- 3'	5'- CAGTAGCAGTCATCCCAGCA- 3'

4.9. Ensaio de atividade indireta de arginase

As células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas ou IFN- γ (1ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Em seguida as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico que mensurou a atividade de arginase pela produção de ornitina. O sobrenadante foi retirado das culturas de células e à elas foi adicionado Triton-x para lise. Para ativação da enzima foram usados os co-fatores cloreto de manganês e Tris HCl por 10 minutos à 55°C. Em seguida foi adicionada a arginina e após 60 minutos na temperatura de 37°C, foi adicionada a solução ácida (H₂SO₄ [96%], H₃PO₄ [85%] e H₂O) e por fim a α -isonitrosopropiophenona. Esses reagentes juntamente com a amostra foram deixados em banho maria à 95°C por 45 minutos. A leitura foi realizada à 540 nm.

4.10. Dosagem de citocinas por ELISA

Os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foram determinados por ELISA sanduiche utilizando conjuntos comerciais e protocolo indicado pelo fabricante (R&D systems). De maneira geral, as placas foram sensibilizadas com 50 μ L de solução contendo anticorpos monoclonais purificados reativos diluídos em tampão fosfato de pH 7,2 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução salina com 0,05% de Tween e bloqueadas com solução de albumina bovina a 1% (BSA 1%) em salina tamponada com fosfato por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes da cultura celular (50 μ L) e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Alguns poços receberam diluições seriadas de cada citocina purificada com concentrações conhecidas, para construção de curva padrão, a partir da qual pode

ser determinada a concentração de cada amostra. As placas foram novamente lavadas e então incubados por duas horas à temperatura ambiente com 50µL de solução contendo anticorpos monoclonais de camundongo específicos para cada citocina dosada marcados com biotina em solução de BSA 1%. Após nova lavagem, a solução contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (R&D systems) foi adicionada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas, ao abrigo da luz, com solução contendo 2µl/ 5 mL de H₂O₂ e 4mg/5 mL de o-fenilenodiamina dihidroclorato (OPD) em tampão citrato com pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escura. A reação foi interrompida pela adição de 20µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância de 492nm de cada poço foi obtida no leitor de microplaca de ELISA.

4.11. Citometria de fluxo

A citometria foi uma ferramenta utilizada para mensurar a expressão e frequência de algumas das várias moléculas de superfície de macrófagos que tem sua expressão modulada de acordo com o estímulo e conseqüente fenótipo da célula.

Após 48 horas incubadas com os lipídios ou apenas meio completo, as células foram estimuladas por 24 horas com IFN-γ (1ng/mL) e LPS (100ng/mL), ou por 48 horas com IL-4 (10ng/mL) ou permaneceram apenas com os lipídios. Após coleta do sobrenadante para outras análises, as células foram desaderidas utilizando-se EDTA 10mM diluído em PBS a 4°C e transferidas para tubos cônicos para centrifugação. Em seguida essas células foram centrifugadas, lavadas com PBS-wash e então foram incubadas com bloqueador de porção Fc de anticorpos. Após lavadas e centrifugadas, as células receberam 10µl de um mix anticorpos (diluídos previamente de acordo com as titulação anteriores) contendo anti-MHCII, anti-CD206, anti-CD11b, anti-F4/80, anti-CD124, anti-TLR2 e anti-CD124. Após a adição dos anticorpos as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C em abrigo de luz. Em seguida foram lavadas com PBS-wash, centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, vertendo-se as placas e o pellet foi ressuspendido em 200 µl de

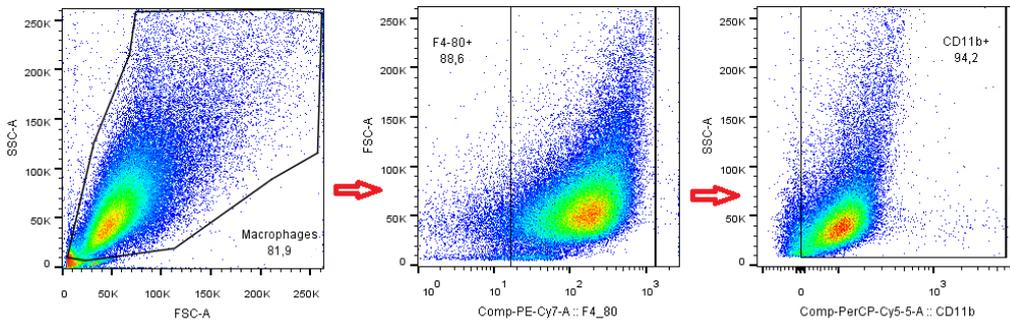
solução fixadora contendo 1% Paraformaldeído. As suspensões celulares foram transferidas para microtubos de leitura e armazenadas a 4°C, protegidas de luz. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura FACSCanto II (Becton Dickinson) acoplado a um computador com o software FACSDIVA (Becton Dickinson).

Tabela 2: Anticorpos usados para citometria

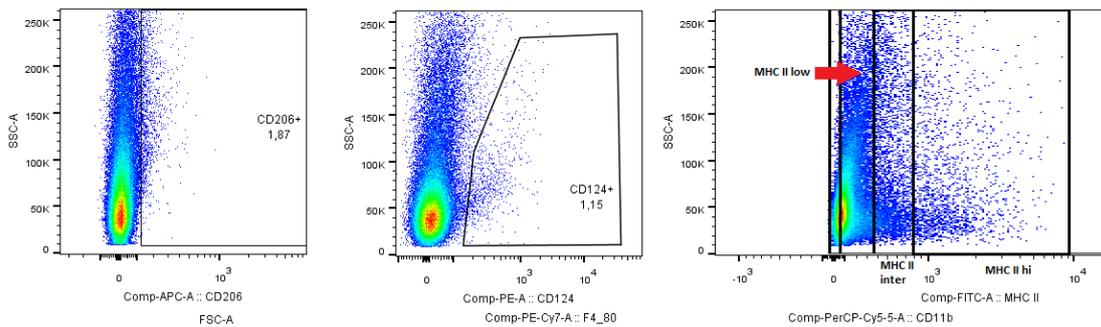
Molécula	Anticorpo	Diluição	Marca
F4/80	Pe-Cy7 (Ficoeritrina <i>Cy-chrome 7</i>)	1:400	Biolegend
Cd11b	Percp-Cy 5.5 (<i>Peridinin chlorophyll cyanine dye</i>)	1:300	BD Pharminogen
MHC2	Biotinilado (IA-IE)	1:100	BD
Estreptavidina	FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	1:200	BD Pharminogen
TLR2	FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	1:300	eBioscience
CD206	APC (Aloficocianina)	1:300	Biolegend
CD 124	PE (Ficoeritrina)	1:200	Biolegend
Fc Block	-	1:100	BD Pharminogen

Foram utilizadas células não marcadas e marcações controles (FMO) para que fossem realizadas as análises. A partir de gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células através do padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (Forward Scatter x Side Scatter), foi feito “gate” na população de granulócitos, a partir deste *gate* foram selecionados os *singlets* com no mínimo 30.000 eventos para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra. As análises posteriores foram feitas utilizando-se o software *FlowJo* (Décima versão).

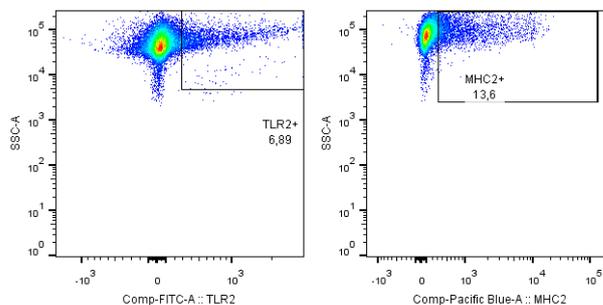
Estratégia de gate



Estratégia de *gate* para análise no programa *FlowJo*: Primeiro selecionou-se a área correspondente à granulócitos e em seguida, dentro deste *gate*, selecionamos as células positivas para F4/80 e dentro deste *gate* as células positivas pra CD11b. As marcações foram estabelecidas positivas à partir do *gate* no FMO respectivo para cada molécula de interesse.



A partir do *gate* de células CD11b+, nós fizemos novos *gates* para células positivas para as moléculas: MHC II, CD124, CD206 e TLR2.



4.12. Infecção dos macrófagos com *Trypanosoma cruzi*

Após 48 horas incubados com os lipídios ou apenas meio completo, os macrófagos foram infectados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener, na proporção de 5 tripomastigotas metacíclicas para cada 1 célula. As células foram divididas em duplicatas para cada lipídio e para cada tempo de infecção. Os grupos controle foram: controle negativo, sem lipídios e não infectado; controle positivo que recebeu 5ng/mL de IFN- γ e foi infectado e controle *T. cruzi*, que foi infectado mas sem tratamento com lipídio ou IFN- γ .

Após 3 horas, a metade das células foi lavada e as lamínulas foram retiradas, fixadas e coradas com conjunto Panótico Rápido de 3 passos (Laborclin®). Após 48 horas a cultura de células restante foi retirada e também lavada e posteriormente fixada e corada com o conjunto de Panótico Rápido. O sobrenadante de 48 horas foi recolhido para outras análises.

Foram capturadas cerca de 10 imagens de cada lamínula na objetiva de 40x e foram contados mais de 100 macrófagos por lamínula. As médias das duplicatas de cada estímulo por animal foram usadas para os cálculos dos valores do percentual de células infectadas e a taxa de parasitos por célula.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos da suplementação *in vitro* com ácidos graxos poli-insaturados em aspectos gerais de macrófagos

Após revisão de literatura sobre quais as concentrações lipídicas são comumente usadas para suplementação *in vitro* de macrófagos, estabelecemos doses principais e testamos se a suplementação com as mesmas poderia alterar a sobrevivência das células. Após 6 e 72 horas de cultivo com lipídios, observamos que a suplementação não exerceu efeito tóxico nas células (Figura 1 A e B). Entretanto, as células estimuladas com IFN- γ + LPS apresentaram baixa sobrevivência após 72 horas em cultura. Portanto, para os demais ensaios, o tempo de cultura estabelecido para as células estimuladas com IFN- γ + LPS foi de 24h.

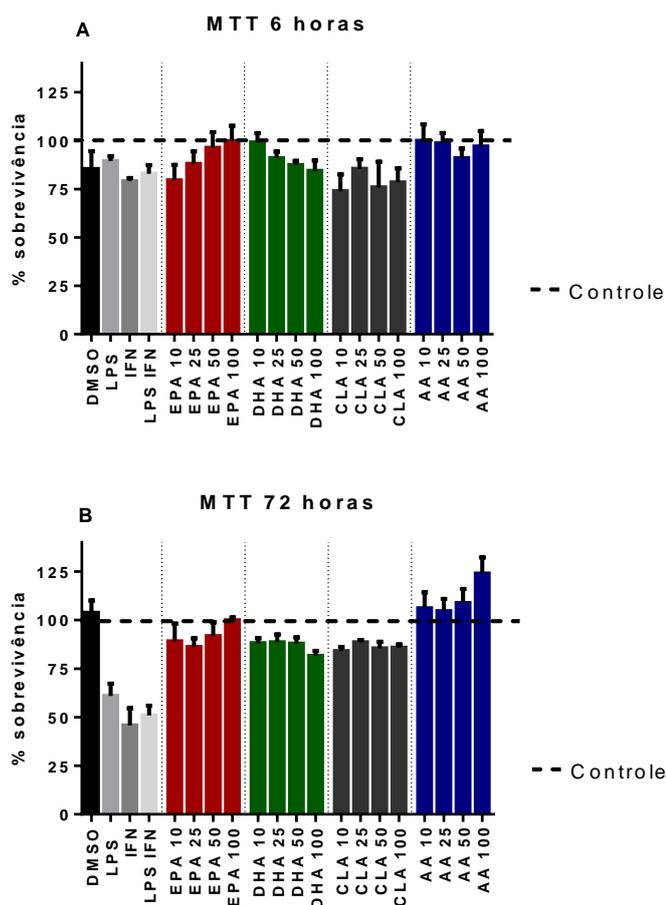


Figura 1: Viabilidade de células após 6 e 72 horas de tratamento. Foram plaqueadas 1×10^6 células/mL e tratadas com lipídios nas concentrações de 10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$, ou com LPS (100ng/ml), ou com IFN- γ (1ng/ml), ou LPS (900ng/ml) + IFN- γ (0,1ng/ml) ou DMSO a 0,01%. As células foram incubadas na presença desses estímulos por 6 horas (tempo mínimo de experimento) (A) ou 72 horas (tempo máximo de experimento) (B). As barras representam a porcentagem de sobrevivência das células tendo como referência células controle não estimuladas (linha tracejada).

Outro parâmetro importante avaliado foi a morfologia dos macrófagos. O espalhamento das células pode indicar maior aderência e ativação. Após o resultado que mostrou que os lipídios não causam efeitos danosos às células, decidimos investigar se eles poderiam influenciar a morfologia celular. O cultivo de macrófagos com os lipídios EPA, DHA e CLA alterou a morfologia dessas células (Figura 2A). O cultivo com o lipídio EPA resultou em maior interferência na adesão dos macrófagos à placa, assemelhando-se às células que foram estimuladas apenas com IL-4. Todavia, os lipídios suplementados com DHA e CLA tiveram efeitos intermediários no aumento de adesão das células à placa, enquanto que a suplementação com o lipídio AA não resultou em mudança significativa no espalhamento das células.

A

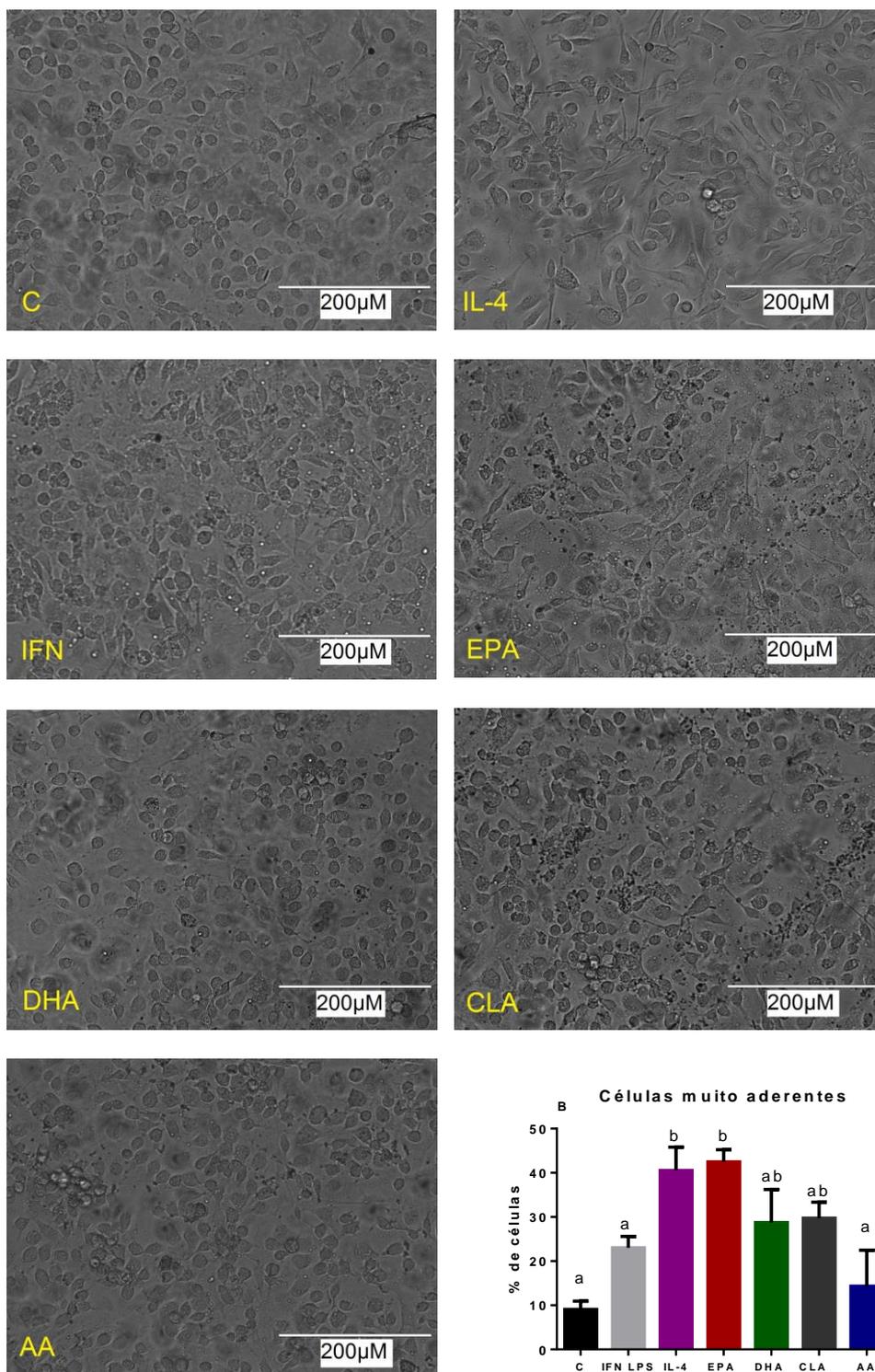


Figura 2: Morfologia de células tratadas com lipídios. Os macrófagos (1×10^6 células/ mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10 ng/ ml) por 48 horas ou IFN- γ (1ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Em seguida, foram capturadas 10 imagens de cada amostra no microscópio digital EVOS FL®, com a objetiva de aumento de 20 vezes. Os macrófagos de um campo das imagens foram classificados com escore de 1 a 4, sendo: 1 células esféricas ou não espalhadas; 2 células pouco espalhadas; 3 células espalhadas, e 4, células muito espalhadas sobre à placa (A e B) As barras no gráfico representam o percentual de células muito aderidas à placa. Barra de escala equivalente à 200µM (B). Análise estatística medida por teste One Way ANOVA, com comparações múltiplas de Holm Sidak. Valor p do teste ANOVA < 0,0001, N = 3 animais.

A aderência dos macrófagos estimulados com IFN- γ + LPS, também chamados de classicamente ativados, e dos macrófagos estimulados com IL-4, também chamados de alternativamente ativados, foi aumentada. Além da aderência, já é bem estabelecido na literatura que macrófagos do tipo alternativamente ativados também possuem maior capacidade fagocítica (Stein *et al.*, 1992; Schumann, 2016). Assim sendo, decidimos analisar qual a influência dos lipídios na capacidade de fagocitose dos macrófagos. A capacidade fagocítica, foi medida por citometria de fluxo pela avaliação da intensidade média de fluorescência de esferas inertes fluorescentes fagocitadas. Os resultados mostraram que o grupo suplementado com o lipídio EPA teve capacidade fagocítica aumentada em relação ao grupo IFN- γ + LPS (Figura 3). Ressaltamos entretanto que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IFN- γ + LPS e C (células sem tratamento).

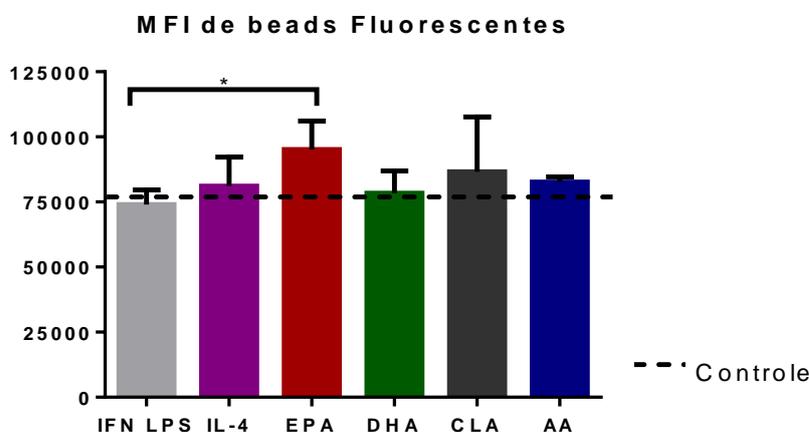


Figura 3: Capacidade fagocítica de macrófagos suplementados com lipídios. As células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas ou com IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo marcado com fluorocromo PE-Cy7 anti-F4/80 por meia hora. Após lavadas com PBS-Wash (PBS + albumina sérica bovina à 0,5%), as amostras foram incubadas com esferas fluorescentes na estufa de CO₂ a 37°C por 45 minutos (aproximadamente 50×10^6 esferas para cada 2×10^6 células). Após esse tempo, as células foram novamente lavadas com PBS-Wash e a leitura foi realizada utilizando-se o citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). As barras representam a Mean Fluorescence Intensity (MFI) medida para cada tratamento. A linha tracejada representa as células não estimuladas e incubadas com esferas fluorescentes. Análise estatística por Teste t entre EPA versus IFN- γ e LPS, com valor $p = 0,04$. N = 3 animais com tratamentos em duplicata.

Dentre os vários papéis fisiológicos já elucidados para o óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos, ele se destaca com um importante agente na eliminação de patógenos. Decidimos, então, investigar se a simples suplementação com lipídios às culturas seria capaz de alterar a produção endógena de NO. Como mostrado na Figura 4A, os macrófagos cultivados com adição de lipídios não tiveram

aumento ou redução na produção endógena de NO em comparação com os macrófagos sem tratamento. Como já esperado, o único grupo a apresentar produção maior de óxido nítrico foi o grupo estimulado com IFN- γ + LPS.

Em seguida, investigamos se, em um contexto com estimulação por citocinas sabidamente envolvidas na diferenciação de macrófagos, os lipídios seriam capazes de influenciar impedindo ou sinergizando com a produção de óxido nítrico esperada para cada perfil de ativação. Sendo assim, mensuramos a produção de óxido nítrico em macrófagos que foram previamente incubados com lipídios e depois estimulados com IFN- γ + LPS (por 24 horas) ou com IL-4 (por 48 horas). Nesse contexto, apenas o lipídio EPA foi capaz de reduzir os níveis de produção de NO produzido pelos macrófagos estimulados com IFN- γ + LPS para níveis próximos daqueles produzidos por células não tratadas e não estimuladas (Figura 4B). Os lipídios DHA e AA mantiveram os níveis de NO intermediários entre o controle estimulado sem suplementação lipídica, enquanto que o lipídio CLA não reduziu a produção de NO (Figura 4B). Já nos macrófagos estimulados com IL-4, os lipídios EPA e DHA reduziram os níveis de NO para abaixo dos valores endógenos encontrados em células sem tratamento (Figura 4C).

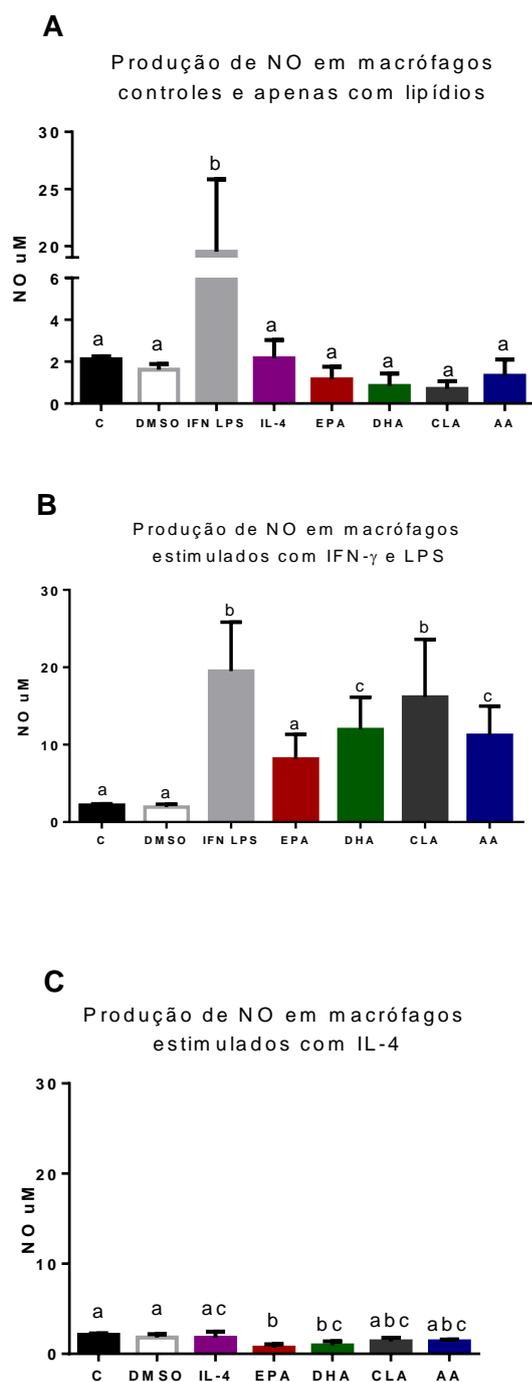


Figura 4: Produção de NO por macrófagos suplementados com lipídeos e estimulados com citocinas. Para o ensaio colorimétrico que mensura indiretamente o óxido nítrico, foi usado o sobrenadante de cultura de macrófagos (1×10^6 células/mL) tratadas com lipídios por 72 horas (A), ou com IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas (B) ou com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas (C). Em seguida, a esse sobrenadante, foi acrescentada a solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4) 2,5% na proporção de 1:1:1. Após 5 minutos de reação, foi acrescentada a solução de naftiletlenodiamino-dicloridrato H_3PO_4 2,5%. A leitura foi realizada em leitor de microplaca em filtro de 540nm. As barras representam a produção de NO (μM) em cada cultura. O teste estatístico realizado foi One-way ANOVA paramétrico com valor $p < 0,0001$, com comparações múltiplas de Tukey. N = 4 animais em duplicatas.

Para complementar os dados que mostraram a influência dos lipídeos na produção de NO, medimos também a transcrição do mRNA para enzima iNOS. O teste de quantificação de RNA mensageiro mostrou que as células estimuladas com IFN- γ + LPS apresentaram expressão aumentada de mRNA, o que foi confirmado pelos resultados de produção de NO quando estimulados com IFN- γ + LPS. Entretanto, quando analisamos separadamente as células tratadas com lipídios comparando-as com a cultura controle sem tratamento, observamos que houve aumento da expressão de iNOS pelas células suplementadas com o lipídio CLA (Figura 5A). Esse dado se confirmou pela não redução da produção de NO nessas células em comparação com as demais avaliadas pelo ensaio de mensuração de NO em células estimuladas com IFN- γ + LPS (Figura 4B).

Uma importante proteína descrita em macrófagos M(IL-4) (também chamados de alternativamente ativados) isolados do pulmão é a proteína FIZZ1 (Murray e Wynn, 2011). Entretanto, após análise por PCR em tempo real dos macrófagos tratados ou não com lipídeos, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de expressão de mRNA para FIZZ1. Todos os grupos de células permaneceram estatisticamente iguais ao controle sem tratamento (Figura 5B).

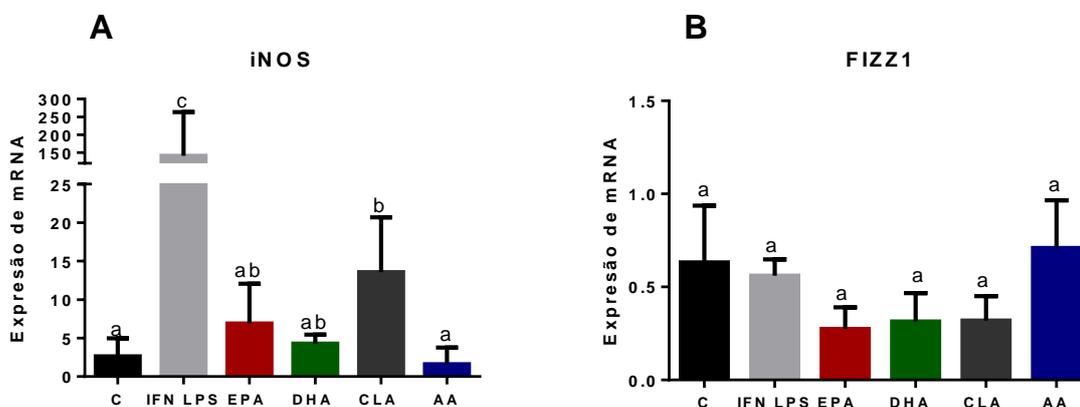


Figura 5: Expressão de mRNA para iNOS e FIZZ1 em macrófagos suplementados *in vitro* com lipídeos. O teste de quantificação de RNA mensageiro foi feito através da reação de cadeia da enzima polimerase. A quantificação relativa do mRNA foi calibrada e normalizada por pelo gene endógeno GAPDH. As barras representam a expressão relativa de mRNA para iNOS e FIZZ1. A análise estatística realizada foi One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas com $\alpha = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey, N = 4.

Outra enzima importante com atividade alterada de acordo com a ativação dos macrófagos é a arginase. A arginase está presente em todos os macrófagos, porém tem alta atividade em macrófagos que aparecem predominantemente em fase tardia da inflamação, ou inflamações crônicas e que recebem estímulos para reparação de tecido (Rath *et al.*, 2014). Neste teste que mede a atividade da arginase pela metabolização da arginina, o lipídio AA mostrou, dentre os 4 lipídios, ter o maior potencial de ativação dessa enzima. O aumento na atividade da arginase foi igual ao de macrófagos estimulados com a citocina IL-4 (Figura 6). Os lipídios EPA e DHA tiveram ativação intermediária, não diferindo dos controles IL-4 e controle apenas com células sem tratamento. A atividade de arginase de células estimuladas com o lipídio CLA não apresentou diferença quando comparada com aquela observada nas células estimuladas com IFN- γ + LPS ou com as células controle sem estímulo.

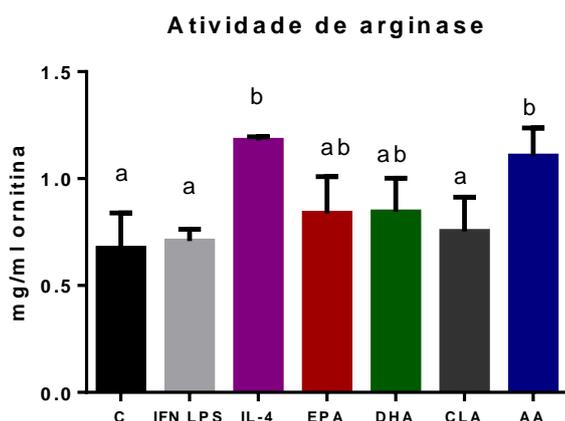


Figura 6: Atividade de arginase induzida em macrófagos suplementados com lipídeos. Os macrófagos (1×10^6 células/ mL) foram tratados com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10 ng/ ml) por 48 horas ou IFN (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Em seguida as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico que mensurou a atividade de arginase pela produção de ornitina. O sobrenadante foi retirado das culturas de células e à elas foi adicionado Triton-x para lise. Para ativação da enzima, foram usados os co-fatores cloreto de manganês e Tris HCl. Em seguida, foi adicionada a arginina e, após o tempo da reação em temperatura ótima, foi adicionada a α -isonitrosopropiophenona. As barras representam a produção de ornitina (mg/ml). Análise estatística foi medida por teste One Way ANOVA, com comparações múltiplas de Tukey. Valor p do teste ANOVA de 0,0007. N = 4 animais, com tratamento e teste de arginase feitos em duplicatas

Outro aspecto analisado foi a produção de citocinas das células tratadas com lipídios e das células tratadas com lipídios e depois estimuladas. Para isso, analisamos a produção de IL-10, IL-6 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura. Os valores das médias dos grupos tratados apenas com lipídios estão mostrados na

Tabela 3. Em relação às citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) apenas os grupos estimulados com IFN- γ + LPS apresentaram aumento detectável na produção. Quanto à IL-10, houve produção basal detectada na maioria dos grupos.

Tabela 3: Médias das produções de citocinas IL-10, TNF- α e IL-6 em macrófagos tratados apenas com lipídios

Médias das produções de citocinas entre os grupos (pg/ mL)								
Citocina:	C	IFN- γ + LPS	IL-4	DMSO	EPA	DHA	CLA	AA
IL-6	0,0	2280,0	N.A.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TNF- α	0,0	3150,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-10	57,7	29,7	17,6	N.D.	N.D.	20,2	8,7	40,1

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foram determinados por ELISA sanduíche. Para a medida das citocinas **TNF- α e IL-10**, as células (1×10^6 células/ mL) receberam tratamento apenas com lipídios por 72 horas e os controles com IL-4 (10 ng/ ml) por 48 horas ou IFN- γ (1 ng/ml) + LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Para a medida da citocina **IL-6**, as células foram estimuladas com IFN- γ + LPS à 0,1 e 900ng/mL respectivamente ou apenas com lipídios por 72 horas. N.D. = Não Detectado. N.A. = Não Avaliado. Análise estatística foi medida por teste One Way ANOVA, com comparações múltiplas de Tukey. N = 3 animais em duplicata.

Como não houve alteração detectável na produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos tratados apenas com lipídios, decidimos investigar se células tratadas com lipídios e posteriormente estimuladas com IFN- γ + LPS ou IL-4 poderiam ter alterações na produção de citocinas. Em relação à citocina IL-6, houve modulação na produção da mesma em células que foram tratadas com lipídios e posteriormente estimuladas. Os lipídios EPA e DHA (da família ômega-3) foram capazes de reduzir a produção de IL-6 por células que receberam estímulos pró-inflamatórios (Figura 7A). Os outros lipídios, CLA e AA, mantiveram a produção de IL-6 igual à do grupo não tratado. Quanto à produção de TNF- α (Figura 7B) em macrófagos estimulados com IFN- γ + LPS, não houve diferença na produção. O mesmo ocorreu para IL-10 (Figura 7C), em macrófagos estimulados com IL-4; não houve diferença entre os grupos. Já em macrófagos estimulados com IFN- γ + LPS, houve aumento de IL-10 no sobrenadante das células que receberam AA, e aumento intermediário nas que receberam CLA (Figura 7D).

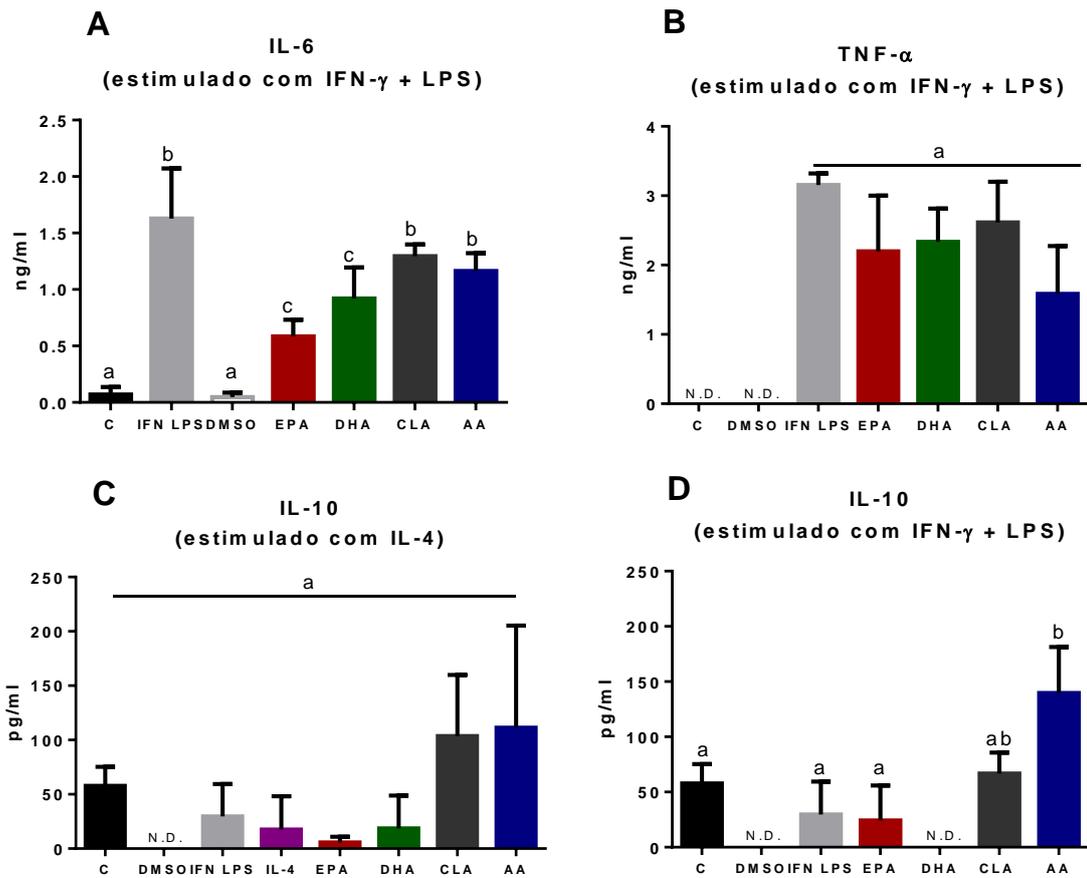


Figura 7: Produção de citocinas em macrófagos tratados com lipídios e posteriormente estimulados: Os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foram determinados por ELISA sanduiche. Para a medida das citocinas **TNF- α** e **IL-10**, as células (1×10^6 células/mL) receberam tratamento apenas com lipídios por 72 horas e os controles com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas ou IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Para a medida da citocina **IL-6**, as células foram estimuladas com IFN- γ + LPS à 0,1 e 900ng/ mL respectivamente ou apenas com lipídios por 72 horas. As barras representam a produção de citocinas em ng ou pg por mL. N.D. = Não detectado. Análise estatística foi medida por teste One Way ANOVA, com comparações múltiplas de Tukey. N = 3 animais em duplicata.

Por fim, investigamos por meio de citometria de fluxo, se haveria alguma alteração na expressão de moléculas de superfície de macrófagos mediante o tratamento com lipídios. Após o tratamento com os lipídios, a frequência de macrófagos que apresentaram alta expressão de MHC de classe II foi modificada (Figura 8A e B). As células que receberam EPA tiveram frequência de células com alta expressão de MHC II (*high*) próximas àquelas encontradas para as células do grupo estimulado com IFN- γ + LPS. Esse resultado sugere que o tratamento com EPA aumentou a capacidade de apresentação de antígenos por essas células. Entretanto, em um contexto de estimulação com IFN- γ + LPS, o tratamento com o

lipídio AA impediu as células de aumentarem a expressão de MHC de classe II como ocorreu nos demais grupos (Figura 8A).

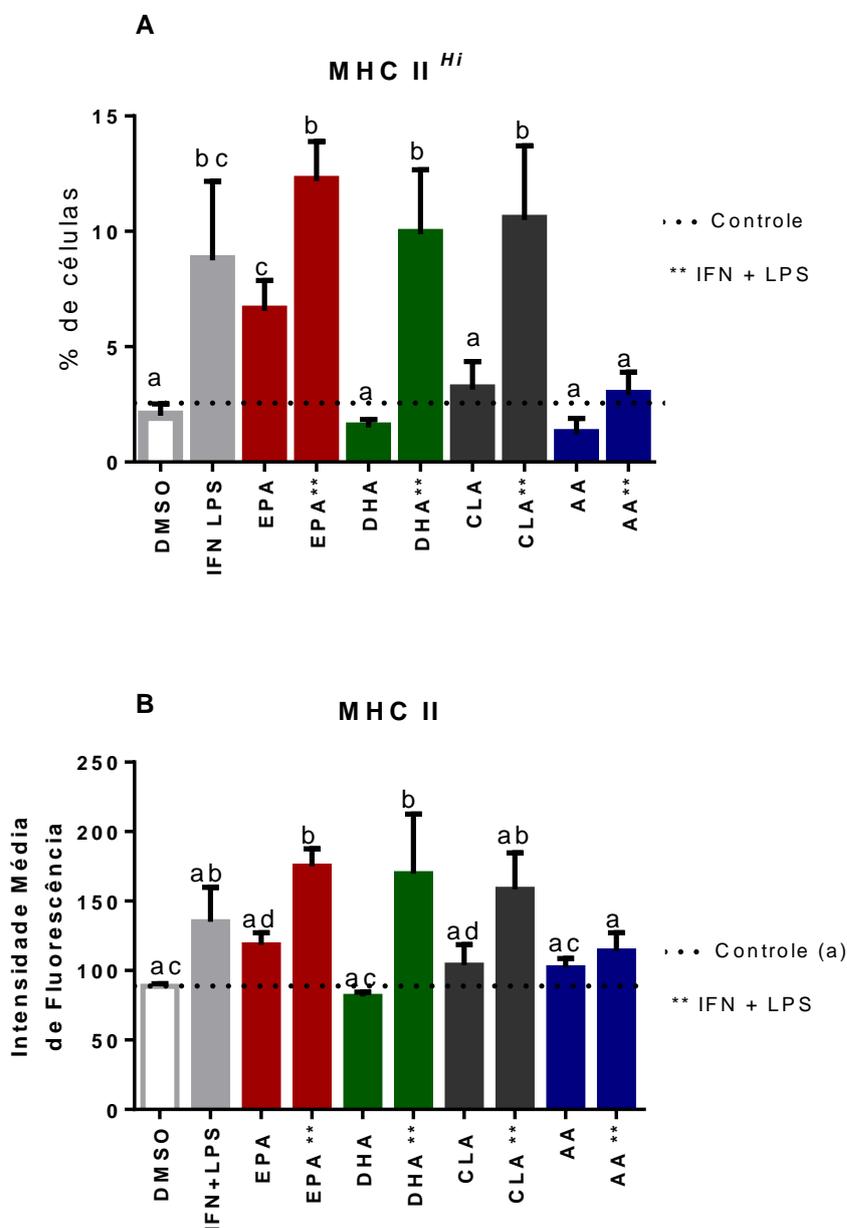


Figura 8: Frequência e Intensidade Média de Fluorescência de MHC II em macrófagos tratados apenas com lipídios e macrófagos posteriormente estimulados. As células (1×10^6 células/ mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas e com IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Os testes estatísticos foram realizados no software Prisma. As barras representam frequência de alta expressão de MHCII ou a média de expressão. A análise estatística para todos os resultados de citometria de fluxo foi One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas, com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey. $N = 3$ ou 4 animais em duplicata. A linha tracejada representa células sem tratamentos ou estímulos. ** = IFN- γ + LPS.

Também foi avaliada a frequência de macrófagos que expressavam a molécula CD124, que é o receptor de IL-4. Essa molécula está presente em macrófagos do tipo M(IL-4) (Murray *et al.*, 2014). A expressão dessa molécula aumentou apenas com o tratamento com o lipídio EPA. Apesar de também pertencer à família de lipídios ômega-3, o lipídio DHA não apresentou o mesmo efeito.

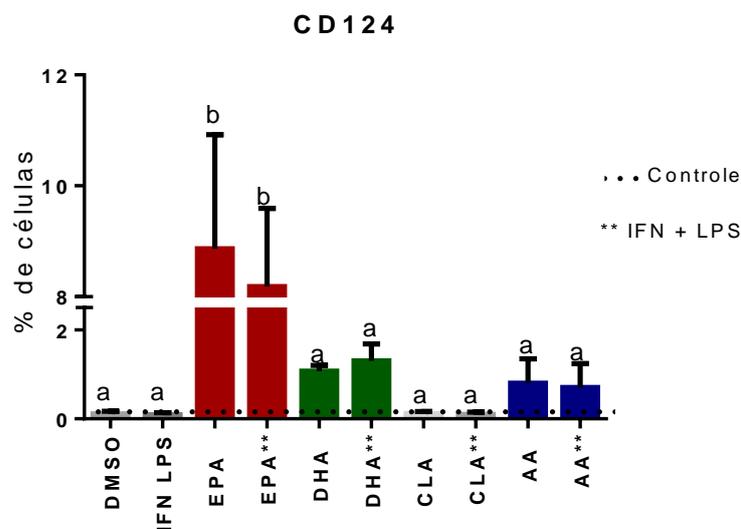


Figura 9: Frequência de células positivas para CD124 após tratamento com lipídios e estimulação com IFN- γ + LPS. As células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas e com IFN- γ (1 ng/ml) + LPS (100 ng/ml) por 24 horas. As barras representam a frequência de células expressando CD124. A linha tracejada representa as células sem tratamentos ou estímulos. ** = IFN- γ + LPS. A análise estatística para todos os resultados de citometria de fluxo foi One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas, com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey. N = 4 animais em duplicata.

A molécula CD206, um receptor de manose, é uma molécula de expressão rara entre macrófagos. Menos de 0,5% dos macrófagos nesse modelo apresentaram essa molécula. Entretanto, dentre os macrófagos suplementados com lipídios, apenas o grupo EPA apresentou aumento significativo no percentual de células positivas para essa molécula e a estimulação com IFN- γ + LPS não foi capaz de diminuir essa frequência (Figura 10).

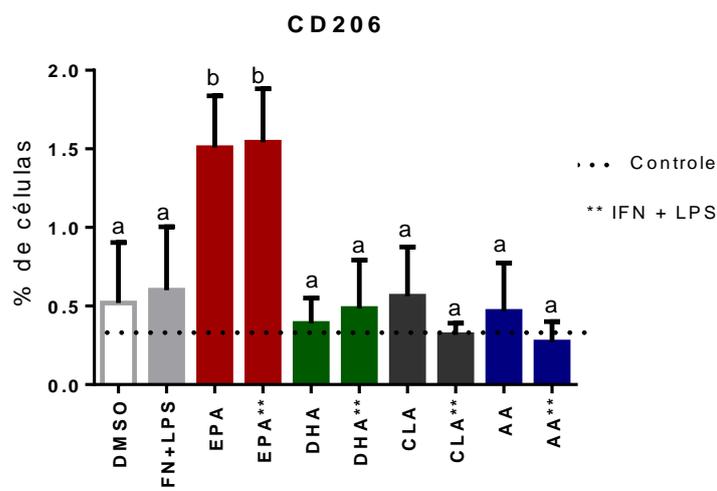


Figura 10: Frequência de células que expressam CD206 após tratamento com lipídios e estimulados ou não com IFN- γ + LPS. As células (1×10^6 células/ mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas e com IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. As barras representam a frequência de células expressando CD206. A linha tracejada representa as células sem tratamentos ou estímulos. ** = IFN- γ + LPS. A análise estatística para todos os resultados de citometria de fluxo foi One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas, com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey. N = 4 animais em duplicata.

Já o receptor semelhante ao *toll* do tipo 2 (TLR2) é geralmente encontrado em células classicamente ativadas (Murray e Wynn, 2011). Neste modelo, o EPA e DHA (família ômega-3) e AA (família ômega-6) aumentaram a expressão dessa molécula quando comparados com os controles (Figura 11A).

Em seguida, testamos a modulação da expressão dessas moléculas em macrófagos já incubados com lipídios e que posteriormente receberam um estímulo ou de IFN- γ e LPS ou de IL-4. Como resultado, o grupo de células tratadas com o lipídio EPA apresentou aumento na expressão de TLR2 sob estímulo com agentes inflamatórios (Figura 11B), o que sugere uma ação sinérgica de EPA com IFN- γ e LPS. Da mesma forma, o grupo de células tratado com EPA aumentou a expressão de TLR2 quando as células foram estimuladas com IL-4 (Figura 11C), enquanto que o tratamento com os lipídios DHA e AA levaram a um aumento intermediário em relação ao controles sem tratamento e ao grupo EPA.

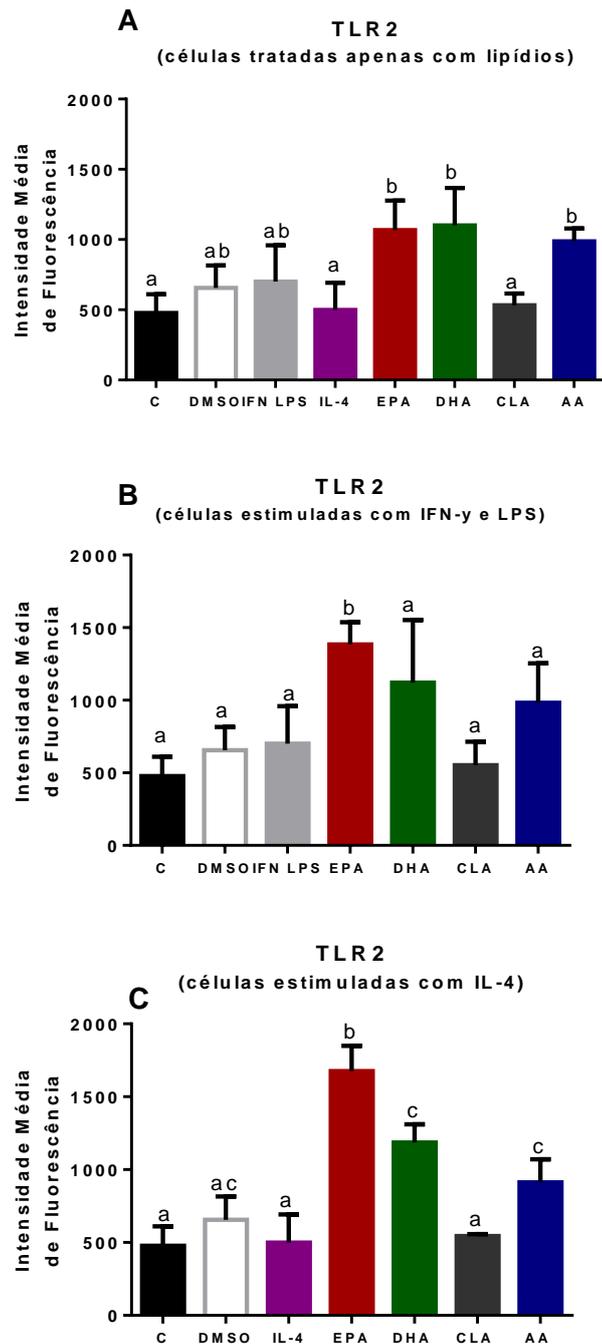


Figura 11: Intensidade Média de Fluorescência da expressão de TLR2 por macrófagos após o tratamento com lipídeos. As células (1×10^6 células/mL) foram tratadas com lipídios por 72 horas, ou com IL-4 (10 ng/ml) por 48 horas ou IFN- γ (1 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) por 24 horas. Expressão de TLR2 representada por barras entre controles e células tratadas apenas com lipídios (A). Expressão de TLR2 representada por barras entre controles e células previamente tratadas com lipídios e então estimuladas com IFN- γ + LPS (B). Expressão de TLR2 representada por barras entre controles e células previamente tratadas com lipídios e então estimuladas com IL-4 (C). A análise estatística para todos os resultados de citometria de fluxo foi One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas, com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey. $N = 3$ animais em duplicata.

5.2. Influência da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados na infecção *in vitro* de macrófagos com *Trypanosoma cruzi*

Por último, avaliamos se os macrófagos tratados *in vitro* com lipídios, teriam sua relação parasito – hospedeiro alterada. Para isso, escolhemos o parasito *Trypanosoma cruzi*, dada a sua importância epidemiológica e o fato de ser um parasito intracelular obrigatório.

Após a suplementação com lipídeos, os macrófagos foram incubados com 5:1 *T. cruzi* por 3 horas. Após as 3 horas, não houve diferença na entrada de parasitos nos macrófagos e nem no percentual de células infectadas entre os grupos tratados e os grupos controles infectados (Figura 12A e B). Entretanto, 48 horas após a infecção, os grupos apresentaram diferenças para os desfechos da infecção. As células infectadas sem nenhum tratamento tiveram a quantidade de amastigostas intracelulares duplicadas (Figura 12B), enquanto que os grupos tratados com IFN- γ mantiveram a taxa inicial de infecção.

Os grupos tratados com os lipídios EPA e DHA tiveram a média de amastigostas por célula intermediária diminuída em relação ao grupo TC (*T. cruzi*) mas maiores que os grupos que receberam IFN- γ . Entretanto, quando o parâmetro analisado foi o percentual de células infectadas após 48 horas (Figura 12A), o único lipídio a se destacar foi o EPA, que, nesse intervalo, foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas. Os outros lipídios obtiveram efeitos intermediários entre o grupo sem tratamento e o grupo EPA.

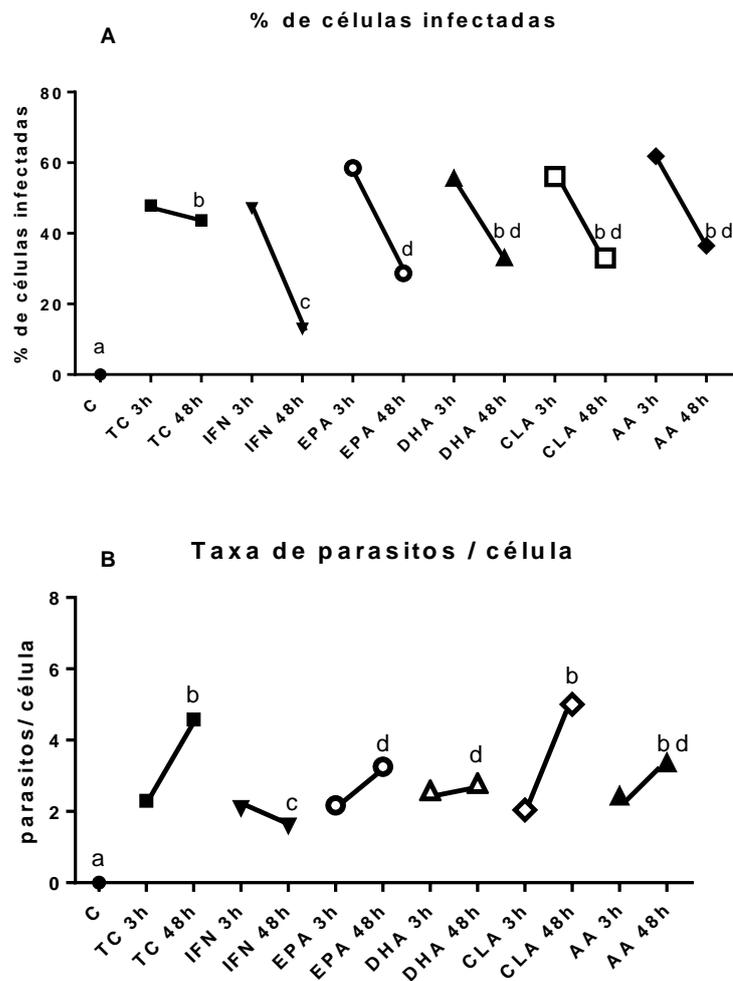


Figura 12: Infectividade de células por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos tratados com lipídios. Após o tratamento com lipídeos, os macrófagos foram infectados com 5:1 tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* da linhagem CL Brener. Após 3 horas e 48 horas foram mensurados a taxa de parasitos por célula de parasitos e o percentual de células infectadas (Figura 11, A e B). Logo após os períodos de infecção, as células foram coradas com o kit panótico e as células foram contadas em microscópio. Os testes estatísticos foram realizados no *software* Prisma. A análise para os resultados de infecção com *T. cruzi* foi feita utilizando-se o teste One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey, $N = 3$.

Tabela 4: Percentual de células que eliminaram o parasito após 48 horas de infecção.

Percentual de células que eliminaram o parasito					
TC	IFN- γ	EPA	DHA	CLA	AA
4,2	34,2	29,8	22,5	23,1	25,4

Tabela 5: Variação em vezes na quantidade de parasitos por células infectadas comparando-se entre 3 e 48 horas de infecção.

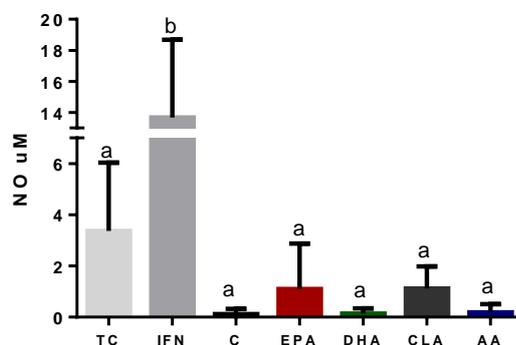
Variação na quantidade de parasitos em células infectadas					
TC	IFN- γ	EPA	DHA	CLA	AA
2,0	0,8	1,5	1,1	2,5	1,4

Tabela que esclarece resultado do gráfico de taxa de parasitos por célula 3 e 48 horas após a infecção.

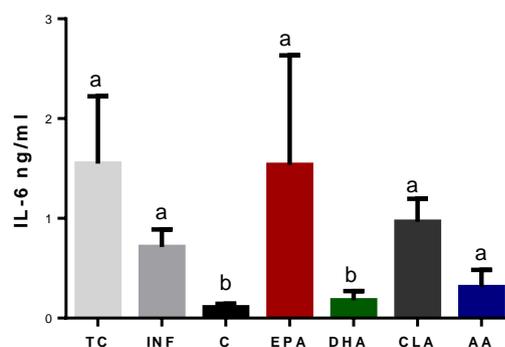
Além de mensurarmos os percentuais de infecção, também mensuramos a produção de óxido nítrico, IL-10 e IL-6 no sobrenadante dos macrófagos infectados, dada a importância do óxido nítrico no controle e eliminação dos parasitos e das citocinas como agentes de ativação celular. Todavia, não houve diferença significativa na produção de NO entre os grupos infectados tratados com lipídios e o grupo infectado sem tratamento (Figura 13A). O produção de NO estava aumentada apenas no grupo que recebeu IFN- γ .

Já em relação à citocina IL-6, houve modulação na sua produção pelos lipídios, com redução da mesma pelo grupo que recebeu DHA para níveis iguais aos níveis dos grupos sem tratamento (Figura 13B). A produção de IL-10 não foi alterada entre os grupos após a infecção com *T. cruzi* (Figura 13C).

A Produção de NO em macrófagos
48 h após a infecção



B Produção de IL-6 em macrófagos
48 h após a infecção



C Produção de IL-10 em macrófagos
48h após a infecção

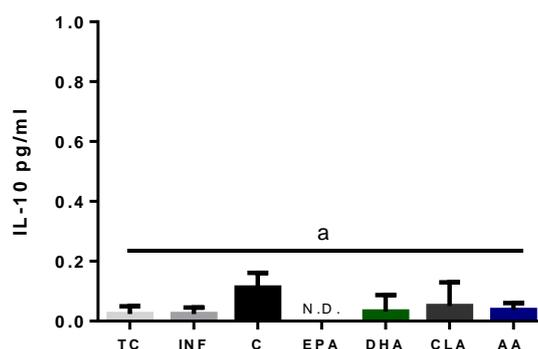


Figura 13: Produção de óxido nítrico e de citocinas por células infectadas com *Trypanosoma cruzi* após a suplementação com lipídeos. Produção (representada por barras) de NO (A), IL-6 (B) e IL10 (C) em macrófagos 48 horas após a infecção. Os macrófagos foram previamente tratados com lipídeos por 48 horas e posteriormente infectados com 5:1 *T. cruzi* cepa CL Brener. Após 48 horas de infecção os sobrenadantes de cultura foram coletados e mediu-se a produção de óxido nítrico e de citocinas IL-10 e IL-6 ou não. N.D. = Não detectado. A análise para os resultados de infecção com *T. cruzi* foi feita utilizando-se o teste One-Way ANOVA com comparação entre as médias das colunas com $p = 0,05$ e comparações múltiplas de Tukey, $N = 3$.

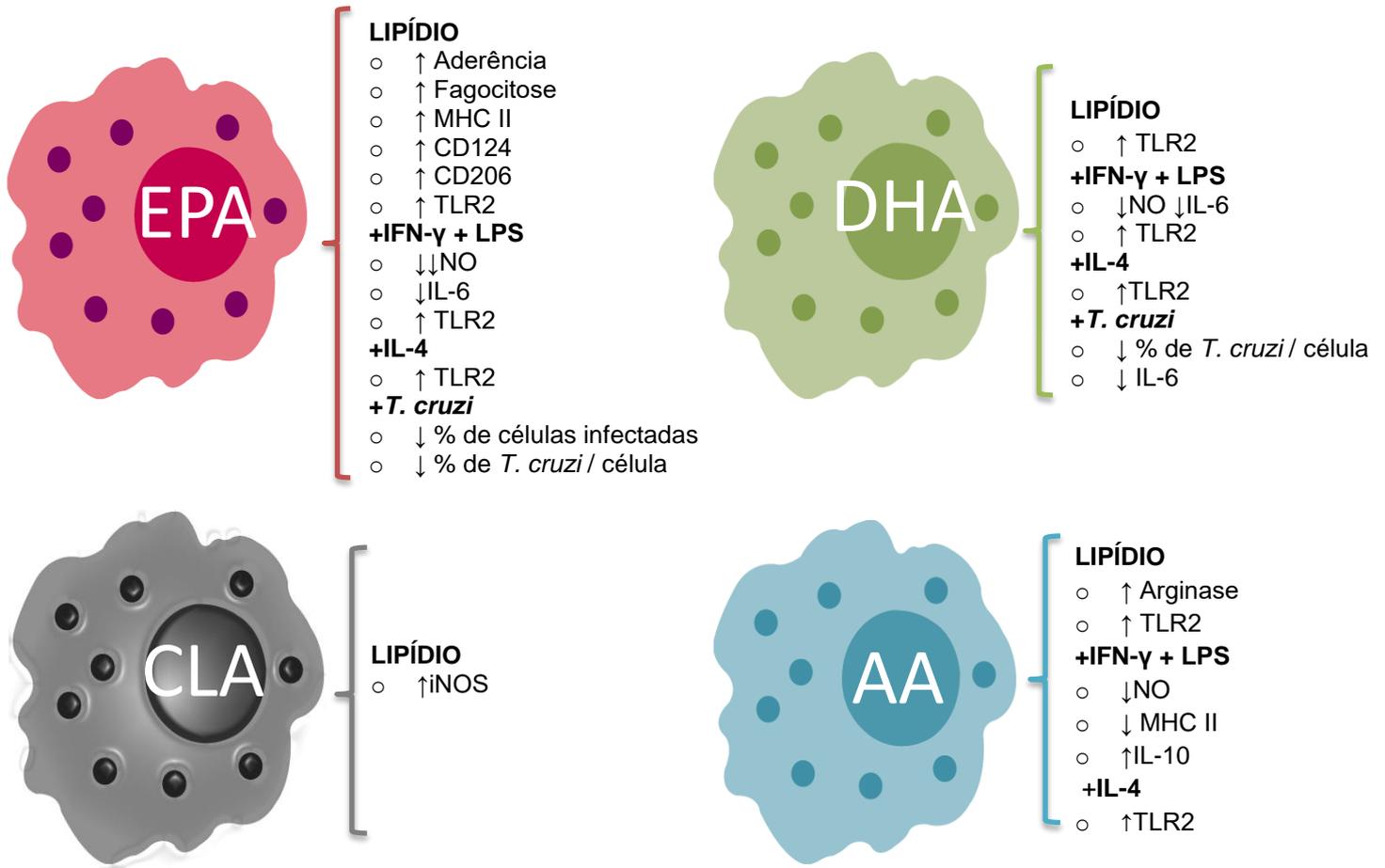


Figura 14: Esquema que sintetiza os principais efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados sobre os macrófagos encontrados neste trabalho.

6. DISCUSSÃO

6.1. O modelo deste estudo

Os macrófagos são células de grande importância na homeostase do organismo e se fazem necessárias em praticamente todos os tecidos. Essas células exercem papéis centrais em diversas fases dos eventos infecciosos, desde o reconhecimento e eliminação de parasitos até o *clearance* dos locais afetados e produção de estímulos para reconstrução tecidual (Ginhoux *et al.*, 2016). Neste estudo, observamos a modulação induzida por lipídios em contextos onde os macrófagos foram cultivados *in vitro*.

Para iniciar os estudos, foram feitos testes para que as concentrações de ácidos graxos estabelecidas nos experimentos não apresentassem toxicidade para as células em cultivo. A concentração de 100µm foi estabelecida por não apresentar efeitos tóxicos às células e por ser eficaz em provocar algum estímulo.

Já com relação ao tempo de incubação, foi definido o tempo de incubação dos macrófagos com lipídeos por 48h, pois já foi descrito que o ácido araquidônico é o ácido graxo com menor taxa de absorção na membrana e que para que esse efeito ocorra são necessárias pelo menos 48h de cultura (Calder *et al.*, 1990).

O meio tioglicolato possui em sua composição substâncias que podem ativar os macrófagos para um perfil classicamente ativado. Sabendo disso, comparamos a produção basal de NO entre macrófagos peritoneais de camundongos recrutados com tioglicolato e macrófagos retirados do peritônio de camundongos apenas com PBS e posteriormente plaqueados com meio completo. Não houve diferença na produção de NO endógena entre ambos. As células recrutadas com tioglicolato, sem tratamento, também não produziram IL-6 ou TNF- α . A expressão ou a frequência de moléculas que indicam polarização do macrófago para classicamente ativado em grupos sem tratamento sempre foi a mais baixa entre os grupos analisados. Sendo assim, acredita-se que os macrófagos usados nos experimentos possuíam uma baixa ativação. Estes, sempre permaneceram em repouso incubados por pelo menos 48h e todos os grupos (culturas de células) foram tratados da mesma forma.

Observa-se também que todos os grupos sempre tiveram a mesma ativação basal, devido ao método de extração em comum.

O modelo que usa macrófagos extraídos com tioglicolato da cavidade peritoneal é dito heterogêneo em células. Na cavidade peritoneal, cerca de 55% das células não são macrófagos. Misharin e colaboradores mostraram, entretanto, que após a extração com tioglicolato e aderência dessas células a placas de cultura, cerca de 80 a 88% das células que permanecem aderidas são de fato macrófagos (Misharin *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, as células sempre foram lavadas e apenas células aderentes foram usadas. Nas análises morfológicas e de citometria, não vimos contaminação relevante com outras células e cerca de 90% das células eram identificadas como macrófagos, não restando dúvidas, assim, de que os dados obtidos nesse trabalho são produzidos de fato por macrófagos.

6.2. Ômega 3 e ativação de macrófagos

O EPA (ácido eicosapentaenóico), pertencente à família de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, teve papel importante no aumento da aderência de macrófagos à placa, semelhante ao que foi observado com o estímulo com a citocina IL-4. Ele também influenciou o aumento na capacidade fagocítica dessas células e levou à redução da produção de IL-6 e NO em contextos com estímulos inflamatórios. Esse lipídio também foi sozinho capaz de aumentar a frequência de células com alta expressão de MHCII, CD124, CD206 e, quando utilizando em conjunto com IL-4 ou IFN- γ e LPS, aumentou a expressão de TLR2 nas células. Já no contexto de infecção *in vitro*, o EPA foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas com *T. cruzi* e também reduziu a replicação de *T. cruzi* dentro das células quando comparado às culturas controle não estimuladas.

Também da família ômega 3, o ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa DHA (ácido docosahexaenóico), apresentou também atividade moduladora no macrófago. Esse lipídio induziu alteração na morfologia de macrófagos, quando comparado com as células sem tratamento e aquelas estimuladas com IL-4. Adicionalmente, teve influência na redução da produção de NO em células estimuladas por IFN- γ +LPS. O DHA foi capaz de reduzir a liberação de IL-6 em células que receberam estímulos pró-inflamatórios e também foi capaz de sozinho

aumentar a expressão de TLR2. Já no contexto de infecção *in vitro*, o DHA reduziu o número de parasitos por célula quando comparado com as células infectadas sem tratamento. Esse lipídio também foi o único a reduzir a produção de IL-6 em células que foram infectadas com *T. cruzi*.

Neste trabalho, o EPA foi o lipídio que se destacou na capacidade de ativação perante os parâmetros analisados, quando observamos que foi o tratamento que modificou a maior quantidade de moléculas expressas e citocinas produzidas. Juntamente com o DHA, esses são os principais lipídios da família ômega 3. Na maioria das vezes, a fonte dietética de ambos é a mesma, porém eles podem apresentar efeitos diferentes nas células. Alguns trabalhos na literatura comparam ambos os ácidos graxos (Dag Halvorsen *et al.*, 1997; Mickleborough *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2012). Estruturalmente são diferentes, pois o DHA possui 2 carbonos a mais que o EPA e conseqüentemente isto influencia a sua capacidade de alterar as propriedades da estrutura da membrana. A desordem da membrana e a permeabilidade a íons livres é maior na presença de DHA na membrana (Gorjão *et al.*, 2009). Em contraste ao DHA, entretanto, o EPA pode também servir como substrato para COX-2 e resultar na síntese de prostaglandinas de série 3 (Needleman *et al.*, 1979).

Vários trabalhos analisaram o efeito desses 2 lipídios nos macrófagos. Em geral, esses ácidos graxos induzem a diferenciação dessas células para um perfil mais anti-inflamatório (Babcock *et al.*, 2002; Skuladottir *et al.*, 2007). Esse perfil se assemelha aos macrófagos alternativamente ativados, uma vez que estes produzem citocinas anti-inflamatórias e a assinatura lipídica inclui mediadores lipídicos também anti-inflamatórios (Rószler, 2015). Os lipídios ômega 3 ainda são capazes de reduzir receptores de citocinas pró-inflamatórias como os dos IFNs (Feng *et al.*, 1999), TLRs (Wong *et al.*, 2009; Hsueh *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) e a produção de citonias pró-inflamatórias (Schoeniger *et al.*, 2011). No presente trabalho, alguns desses parâmetros de perfil anti-inflamatório foram encontrados em células suplementadas com EPA ou DHA. Os macrófagos, quando estimulados com IFN- γ + LPS, apresentaram menor secreção de IL-6 e NO. O DHA sozinho também reduziu a produção de IL-6 em macrófagos infectados com *T. cruzi*. Além disso, observou-se que a suplementação com EPA aumentou a frequência de células expressando as

moléculas CD206, CD124 e MHCII, e também aumentou a capacidade fagocítica e a aderência dos macrófagos à placa, características essas que também estão presentes em macrófagos do tipo M(IL-4), ou os chamados alternativamente ativados (Wirth *et al.*, 1989; Schilling *et al.*, 2014; Röszer, 2015; Zanluqui *et al.*, 2015). No trabalho de Hopperton e colaboradores, foram avaliadas células da micróglia (Hopperton *et al.*, 2016) de camundongos transgênicos para *fat1* (que transforma ômega-6 em ômega-3) e de camundongos suplementados com óleo de peixe sendo que ambos os grupos apresentaram alterações morfológicas nos macrófagos do sistema nervoso. Essas alterações incluíam aumento no número de ramificações citoplasmáticas (*end points*). Entretanto, é necessário ressaltar que ambas as fontes de ômega-3 não eram exclusivas e tampouco majoritariamente de EPA (Kang *et al.*, 2004). Já no estudo de Chang e colaboradores, as células tratadas com DHA não apresentaram alterações na morfologia comparadas com os grupos controles, porém elas preveniram a hipertrofia induzida por LPS ao serem estimuladas com o mesmo (Chang *et al.*, 2015).

Alguns estudos analisaram a relação entre lipídios, infecção e a capacidade fagocítica, de macrófagos. Sargi e colaboradores estudaram essa relação em camundongos alimentados com dieta suplementada em ômega 3 que tiveram seus macrófagos retirados, cultivados e infectados com o fungo *Paracoccidioidomycosis*. Esses macrófagos aumentaram a produção de NO e reduziram a produção de prostaglandina 2 (PGE₂) (Sargi *et al.*, 2013). A PGE₂ é um agente inflamatório derivado da metabolização do AA. Quando se diminui a quantidade do AA na membrana, por competição com EPA, por exemplo, esse mediador também é reduzido. A redução da PGE₂ induzida por esses lipídios também está relacionada com melhora na capacidade fagocítica dos macrófagos (Aronoff *et al.*, 2004). Entre vários lipídios utilizados na suplementação de macrófagos, os que receberam AA foram os que menos fagocitaram (Calder *et al.*, 1990).

Apesar do clássico papel anti-inflamatório ou mesmo imunossupressor atribuído aos lipídios ômega 3, neste trabalho os macrófagos tratados com EPA e DHA apresentaram um comportamento ambíguo ao compartilharem algumas características com macrófagos geralmente classificados como classicamente ativados. Os macrófagos que receberam suplementação de EPA e DHA reduziram a

taxa de parasito por célula em macrófagos infectados, além de aumentarem a expressão de TLR2 mesmo quando co-estimulados com IL-4. Além disto, o EPA sozinho foi capaz de também reduzir o percentual de células infectadas. O aumento da expressão de TLR2 não confirma outros achados da literatura. Geralmente os lipídios ômega 3 têm sido relacionados com o bloqueio da via dos TLRs. Um dos mecanismos propostos para isso é a maior flexibilização na estrutura das balsas lipídicas presentes na membrana celular após a suplementação, o que impede a dimerização das sub-unidades de TLR (Wong et al., 2009). Não podemos afirmar se o aumento na expressão de TLR2 foi concomitante com a ativação das vias de sinalização iniciadas pela ligação de moléculas a esse receptor.

Já o aumento na frequência de células com alta expressão de MHCII é um resultado compartilhado tanto entre macrófagos classicamente como alternativamente ativados (Cao et al., 1989). Porém, no estudo de Fujikawa, utilizando modelo de cultura de esplenócitos, observou-se diminuição da capacidade de apresentação de antígeno em células que receberam EPA (Fujikawa *et al.*, 1992). O aumento da expressão de MHCII é mais um parâmetro que sugere maior ativação da célula, em relação ao grupo controle que não recebeu o lipídio, já que esse evento em geral ocorre em células em estágios mais avançados de ativação durante a apresentação de antígenos.

6.3. Efeitos do ômega 6 em macrófagos

O ácido araquidônico (AA), único representante de fato da família ômega-6 neste trabalho, também apresentou papel relevante na modulação da ativação de macrófagos. Este, reduziu a produção de NO em células estimuladas com IFN- γ + LPS, e como esperado, foi o único a aumentar a atividade de arginase, assim como o grupo estimulado com a citocina IL-4. Os grupos tratados com este ácido graxo não tiveram a produção de IL-6 alterada, porém foram os únicos a aumentar a produção de IL-10, ambos em contextos de células com estímulos pró-inflamatórios. O AA, por sua vez, impediu o aumento da frequência de células com alta expressão de MHCII nos contextos de estímulos inflamatórios. Esse ácido graxo também influenciou no aumento do receptor TLR2 tanto quando testado sozinho, quanto com

a participação de IL-4. Em contexto de infecção, este lipídio reduziu o número de células infectadas e a replicação dos parasitos quando comparado ao controle não estimulado.

O lipídio ômega 6 também se mostrou modulador da ativação das células dentro das condições analisadas. Já é mostrado que, quando suplementado em culturas de macrófagos, esse lipídio é o que melhor se incorpora à membrana celular. De fato, este é o lipídio PUFA mais frequente entre os fosfolipídios de membranas celulares (Calder *et al.*, 1990).

Alguns trabalhos na literatura mostram que o ácido araquidônico está mais ligado à processos inflamatórios, como ativação da via de NFκB (Camandola *et al.*, 1996). Porém, existem trabalhos mostrando que existe alguma ação anti-inflamatória desses lipídios também. Chiu e colaboradores observaram alívio de colite em camundongos tratados com ômega 6 e, em cultura de células com este lipídio, encontraram redução de TNF-α e da atividade de iNOS, aumento na capacidade fagocítica e no fenótipo que classificaram como “M2” (Chiu *et al.*, 2012). Já Schoeniger e colaboradores, observaram que tanto lipídios ômega 3 como ômega 6 reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias, lisozima e CD86 (Schoeniger *et al.*, 2011).

Nossos dados mostram que o perfil de ativação por AA (assim como nos macrófagos suplementados com ômega 3) também compartilha características de macrófagos classicamente ativados e alternativamente ativados. O AA foi capaz de reduzir a produção de NO em macrófagos estimulados com IFN-γ e LPS, mas, curiosamente, o AA no mesmo contexto de estimulação impediu as células de aumentarem a expressão de MHCII, diferentemente dos outros lipídios. Um dado similar a este foi encontrado por Philip Calder que demonstrou a redução na expressão de MHCI em linfoblastos suplementados com AA (Calder, 2007).

Já é descrito (Bansal *et al.*, 2005) que as prostaglandinas formadas a partir do AA aumentam a atividade de arginase. De forma similar, os macrófagos alternativamente ativados, ou também chamados de M(IL-4), apresentam aumento na atividade dessa enzima (Röszer, 2015). Os nossos resultados mostram que as

células que receberam AA também tiveram aumento na atividade de arginase, assim como aquelas do grupo que recebeu IL-4.

6.4. Efeitos do CLA em cultura de macrófagos

O CLA (ácido linoleico conjugado) com estrutura química semelhante ao ácido linoleico da família ômega-6, porém com ligações *cis-trans*, teve efeitos interessantes em alguns aspectos observados em macrófagos. Em culturas onde estavam presentes estímulos inflamatórios que induziam a síntese de NO, esse ácido graxo foi o único a não impedir a produção de NO. Adicionalmente, o CLA também foi sozinho capaz de aumentar a expressão de mRNA para iNOS, enzima requerida para a produção de NO. Esse lipídio também não interferiu na produção de IL-6 e nem de TNF- α em contexto inflamatório e nem na atividade da arginase. No contexto infeccioso, apesar de auxiliar na diminuição de células infectadas, foi o lipídio que menos interferiu na replicação dos parasitos, mantendo a carga parasitária tão alta quanto no grupo sem tratamento.

Este lipídio tem sido descrito como modulador do macrófago no sentido de exercer um papel anti-inflamatório. No trabalho de Yu e colaboradores, foi observado que o tratamento de macrófagos com CLA reduziu a expressão de COX₂ e iNOS, os níveis produzidos de PGE₂, NO e IL-6 (Yu *et al.*, 2002). Já em outro trabalho, além de diminuir a expressão de COX₂, o CLA também estimulou o aumento da capacidade fagocítica dessas células (Stachowska *et al.*, 2007).

No nosso trabalho, dentro dos parâmetros de ativação testados, o CLA foi o lipídio que teve menor efeito sobre os macrófagos. Em alguns contextos experimentais, as células tratadas com esse lipídio se comportaram como as células sem tratamento, tendo influência nula na redução da secreção citocinas pró-inflamatórias. No contexto de infecção, enquanto a replicação de parasitos dentro das células infectadas sem tratamento aumentou 2 vezes, esse aumento foi de 2,5 vezes nas células tratadas com CLA. Outros lipídios induziram aumento menor ou igual a 1,5 vezes na replicação do parasito. Entretanto, as células tratadas com CLA apresentaram aumento na expressão de iNOS quando comparadas àquelas tratadas com outros lipídios ou às células sem tratamento, o que pode ter relação com a não redução da produção de NO em células que foram estimuladas com IFN- γ + LPS.

6.5. Influência dos lipídios na relação parasito-hospedeiro

Neste trabalho, foi demonstrada a importância dos lipídios na modulação e ativação de macrófagos. Nos testes utilizados, o lipídio EPA teve, de uma forma geral, maior efeito na ativação dos macrófagos quando comparado aos demais lipídios. O efeito produzido nos macrófagos pelo tratamento com esse lipídio compartilhou algumas similaridades com o perfil de macrófagos M(IL-4) e M(IFN- γ), e ambas as formas já são descritas como tendo influência em desfechos de infecção com *T. cruzi* (M2a: Wirth *et al.*, 1989; Rodrigues *et al.*, 2000; Zanluqui *et al.*, 2015).

Outros estudos também mostram que os lipídios são capazes de influenciar os macrófagos na eliminação de parasitos. No trabalho de Schoeniger, por exemplo, o cultivo de células com os lipídios ômega 3 e 6 durante a primeira e oitava semanas de infecção com os fungos *Rhodococcus equi* e *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de influenciar no aumento da capacidade fungicida dos macrófagos, mensurado pela redução de unidades formadoras de colônia no sobrenadante dessas células (Schoeniger *et al.*, 2011). Porém, no trabalho de Bonilla e colaboradores, a incorporação de ômega 3 na membrana de macrófagos tratados *in vitro* com esse lipídio reduziu a eliminação de *M. tuberculosis* pelos macrófagos (Bonilla *et al.*, 2010). O lipídio EPA foi também estudado *in vivo*, utilizando-se suplementação da dieta de camundongos infectados com *T. cruzi*. Entretanto, nesse caso, a suplementação resultou em maior mortalidade do grupo de animais tratados quando comparados com os controles, sem que houvesse diferença na parasitemia (Takeda *et al.*, 1995)

Apesar da capacidade de eliminar patógenos pelos macrófagos M(IL-4) ter sido descrita em vários estudos (Wirth *et al.*, 1989; Solbach *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 2011; Zanluqui *et al.*, 2015), este ainda é um resultado polêmico na literatura (Rodrigues *et al.*, 2000). É válido ressaltar que os resultados relatados derivam de estudos utilizando uma variedade de modelos experimentais, com macrófagos peritoniais extraídos com tioglicolato ou não, macrófagos de linhagens, macrófagos pulmonares, macrófagos de medula e ainda diferentes tipos de patógenos, o que

dificulta uma conclusão de quais fenótipos e modelos experimentais são de fato mais efetivos para se estudar o efeito na eliminação de parasitos por macrófagos (Hiyama *et al.*, 2001; Bonilla *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2011; Schoeniger *et al.*, 2011).

Vários mecanismos podem explicar o resultado aqui apresentado sobre a participação de EPA e DHA na eliminação de parasitos de células infectadas. Um desses mecanismos é a necessidade de quantidades razoáveis de ROS para que o *T. cruzi* se replique. Segundo Goes e colaboradores, células parasitárias que são tratadas previamente com baixas quantidades de H₂O₂ apresentaram maior infectividade, ao passo que células que tinham a produção de ROS inibida, não aumentaram a carga parasitária (Goes *et al.*, 2016). Nesse sentido, apesar de não termos dados relativos à produção de ROS, hipotetizamos que um mecanismo semelhante pode estar atuando nas culturas que testamos. Como a suplementação com os lipídios EPA e DHA influenciou a produção de NO em macrófagos estimulados, existe a possibilidade de esses lipídios também influenciarem na quantidade de ROS no contexto de infecção, aumentando-a ou reduzindo-a demasiadamente, e assim o sinal de ROS para a replicação do parasito não ser favorável à replicação.

Outro fato interessante observado foi a taxa de parasitos por célula ter sido reduzida após o tratamento com EPA. Como vimos ao longo do trabalho, alguns parâmetros de ativação avaliados no grupo que recebeu esse lipídio se assemelharam a características encontradas também em macrófagos diferenciados para um perfil alternativamente ativado (estimulado por IL-4). Um dos mecanismos de ação da IL-4 é a sua ação sinérgica com o IFN- γ para estimular a produção endógena de TNF- α e, assim, aumentar a eliminação de patógenos (Solbach *et al.*, 1991). O EPA também é um ligante para PPAR (Sethi *et al.*, 2002). No trabalho de Lefrève, o tratamento com ligantes de PPAR- γ de macrófagos infectados com *Candida albicans* levou à polarização dessas células para um perfil “M2a” (alternativamente ativado) e à eliminação da bactéria no local de infecção (Lefrève *et al.*, 2010).

Os parâmetros que os macrófagos que receberam EPA compartilham com os alternativamente ativados incluem a maior aderência, fagocitose, redução de IL-6,

aumento na frequência de células expressando CD124 e CD206 assim como a capacidade de eliminar parasitos. Na literatura também são encontradas outros relatos de similaridades como, por exemplo, a inibição de COX₂ tanto por EPA, quanto por IL-4 (Hinz e Brune, 2002).

Assim sendo, existe a possibilidade de que os mecanismos pelos quais a carga parasitária esteja reduzida no grupo de células tratado com EPA seja por mecanismos similares àqueles induzidos por IL-4. Outros mecanismos ainda não elucidados que induzam a alteração na produção de ROS para níveis não favoráveis à replicação podem estar atuando.

A ativação de macrófagos pode ser mensurada por vários parâmetros em diversas condições de estimulação. Dentro das condições analisadas, o lipídio EPA teve maior efeito na ativação dessas células. Isto pode ter ocorrido pelo fato de EPA ser um lipídio que diminui a incorporação de AA aos fosfolípidios da membrana e diminui seu metabolismo (Nieves e Moreno, 2006) quando comparado ao AA, ou mesmo por este primeiro ter estrutura química com propriedades diferentes do CLA (Subbaiah *et al.*, 2011), que possui uma ligação trans, ou ainda pelo fato de o EPA ser preferido pela COX, quando comparado com o DHA (Nieves e Moreno, 2006).

Cada lipídio, mesmo os que apresentaram menor efeito na ativação de macrófagos dentro das condições avaliadas, pode levar os macrófagos para momentos funcionais diferentes. Desta forma, seria também interessante avaliar esses lipídios em macrófagos de outros tecidos e organismos, incluindo humanos. Além disso, seria interessante, para uma melhor compreensão dos seus efeitos na ativação dessas células, mensurar os eicosanoides produzidos e investigar se são estes, e quais destes, os responsáveis pela ativação celular.

7. CONCLUSÕES

Dentro dos parâmetros avaliados, o EPA teve maior efeito na ativação dos macrófagos estimulados *in vitro*, polarizando essas células para um perfil que se assemelha ao de macrófagos M(IL-4).

O tratamento com DHA apresentou algumas similaridades com os efeitos produzidos pelo EPA, porém em menor grau.

O AA modulou a ativação dos macrófagos aumentando a atividade da arginase e reduzindo a produção de óxido nítrico.

A suplementação de macrófagos *in vitro* com os lipídios EPA, DHA e AA provocou efeitos semelhantes àqueles observados em macrófagos não-classicamente ativados.

O CLA foi o lipídio que menor efeito apresentou na ativação dos macrófagos, talvez por não atuar nos parâmetros avaliados.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, objetiva-se:

- Quantificar e identificar, quais eicosanoides são produzidos pelos macrófagos tratados com EPA;
- Identificar receptores responsáveis pela ativação que ocorre com EPA
- Verificar se há ação direta do EPA no parasito;
- Mensurar ROS produzidos por macrófagos suplementados in vitro com EPA; suplementados com esse lipídio e desafiados com IFN- γ + LPS ou IL-4 e suplementados com EPA e infectados;
- Quantificar a expressão de mRNAs para PPAR- γ e NF κ B em macrófagos tratados in vitro com EPA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015. ISBN 853528320X.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999. ISSN 0732-0582.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life sciences**, v. 75, n. 6, p. 639-653, 2004. ISSN 0024-3205.

ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 1, p. 559-565, 2004. ISSN 0022-1767.

BABCOCK, T. A. et al. Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF- α production. **Surgical infections**, v. 3, n. 2, p. 145-149, 2002. ISSN 1096-2964.

BANNI, S. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current opinion in lipidology**, v. 13, n. 3, p. 261-266, 2002. ISSN 0957-9672.

BANSAL, V. et al. Interactions between fatty acids and arginine metabolism: implications for the design of immune-enhancing diets. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 29, n. 1 suppl, p. S75-S80, 2005. ISSN 0148-6071.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. Trypanosoma cruzi: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. 2013.

BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R.; BEITZ, D. Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. **Clinical Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 451-459, 2002. ISSN 0261-5614.

BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 127, n. 3, p. 777-791, 2004. ISSN 0016-5085.

BEGUIN, P. et al. Effect of polyunsaturated fatty acids on tight junctions in a model of the human intestinal epithelium under normal and inflammatory conditions. **Food & function**, v. 4, n. 6, p. 923-931, 2013.

BELLÓN, T. et al. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 2995-3005, 2011. ISSN 0931-0509.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BONILLA, D. L. et al. Incorporation of a Dietary Omega 3 Fatty Acid Impairs Murine Macrophage Responses to Mycobacterium. 2010.

BUCZYNSKI, M. W.; DUMLAO, D. S.; DENNIS, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 6, p. 1015-1038, 2009. ISSN 0022-2275.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids alter the rules of engagement. 2007. ISSN 1746-0875.

CALDER, P. C. et al. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemical Journal**, v. 269, n. 3, p. 807-814, 1990. ISSN 0264-6021.

CAMANDOLA, S. et al. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 229, n. 2, p. 643-647, 1996. ISSN 0006-291X.

CAO, H. et al. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 11, p. 3524-3531, 1989. ISSN 0022-1767.

CHANG, P. K. et al. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 34, 2015. ISSN 1742-2094.

CHIU, C.-Y. et al. Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. **Inflammation Research**, v. 61, n. 9, p. 967-976, 2012. ISSN 1023-3830.

CORSETTO, P. A. et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 73, 2011. ISSN 1476-511X.

DAG HALVORSEN, S. et al. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. **Lipids**, v. 32, n. 9, p. 935-942, 1997. ISSN 0024-4201.

DE GAETANO, M. et al. Conjugated linoleic acid induces an atheroprotective macrophage M Φ 2 phenotype and limits foam cell formation. **Journal of Inflammation**, v. 12, n. 1, p. 15, 2015. ISSN 1476-9255.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: host cell interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8876.

DE VASCONCELOS GENEROSO, S. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 54, 2015. ISSN 1476-511X.

EPELMAN, S. et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 91-104, 2014. ISSN 1074-7613.

FENG, C.; KEISLER, D.; FRITSCHKE, K. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce IFN-gamma receptor expression in mice. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 19, n. 1, p. 41-48, 1999. ISSN 1079-9907.

FERRANTE, C. J. et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 921-931, 2013. ISSN 0360-3997.

FLEMING, B. D.; MOSSER, D. M. Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy. **European journal of immunology**, v. 41, n. 9, p. 2498-2502, 2011. ISSN 1521-4141.

FUJIKAWA, M. et al. Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. **Immunology**, v. 75, n. 2, p. 330, 1992.

GARCIAS, T. M.; *Efeitos imuno-modulatórios do ácido linoléico conjugado (CLA) na colite e no adenocarcinoma de cólon murino*. 2015. f.164. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GERRARD, T. L.; DYER, D.; MOSTOWSKI, H. IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor selectively increase HLA-DR and HLA-DP antigens but not

HLA-DQ antigens on human monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4670-4674, 1990. ISSN 0022-1767.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 439-449, 2016. ISSN 1074-7613.

GINHOUX, F. et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature immunology**, v. 17, n. 1, p. 34-40, 2016. ISSN 1529-2908.

GOES, G. R. et al. Trypanosoma cruzi needs a signal provided by reactive oxygen Species to infect macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004555, 2016. ISSN 1935-2735.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003. ISSN 1474-1733.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010. ISSN 1074-7613.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005. ISSN 1474-1733.

GORJÃO, R. et al. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. **Pharmacology & therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 56-64, 2009. ISSN 0163-7258.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981. ISSN 0027-8424.

GUILLIAMS, M. et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 10, p. 1977-1992, 2013. ISSN 0022-1007.

HAJIANFAR, H.; PAKNAHAD, Z.; BAHONAR, A. The effect of omega-3 supplements on antioxidant capacity in patients with type 2 diabetes. **International journal of preventive medicine**, v. 4, 2013. ISSN 2008-7802.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013. ISSN 1074-7613.

HELLER, A. R.; THEILEN, H. J.; KOCH, T. Fish or chips? **Physiology**, v. 18, n. 2, p. 50-54, 2003. ISSN 1548-9213.

HEY, C.; WESSLER, I.; RACKÉ, K. Nitric oxide synthase activity is inducible in rat, but not rabbit alveolar macrophages, with a concomitant reduction in arginase activity. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 351, n. 6, p. 651-659, 1995. ISSN 0028-1298.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2—10 years later. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367-375, 2002. ISSN 0022-3565.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology research**, v. 87, n. 4, p. 269-274, 2001. ISSN 0932-0113.

HOLCOMB, I. N. et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. **The EMBO journal**, v. 19, n. 15, p. 4046-4055, 2000. ISSN 0261-4189.

HOPPERTON, K. E. et al. Brain omega-3 polyunsaturated fatty acids modulate microglia cell number and morphology in response to intracerebroventricular amyloid- β 1-40 in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 257, 2016. ISSN 1742-2094.

HSUEH, H. W. et al. Stearidonic and eicosapentaenoic acids inhibit interleukin-6 expression in ob/ob mouse adipose stem cells via toll-like receptor-2–Mediated pathways. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 7, p. 1260-1266, 2011. ISSN 0022-3166.

HUGHES-FULFORD, M. et al. Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1427-1433, 2006. ISSN 0008-5472.

KANG, J. X. et al. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. **Nature**, v. 427, n. 6974, p. 504-504, 2004. ISSN 0028-0836.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. **Journal of Internal Medicine**, v. 208, n. 1-6, p. 401-406, 1980. ISSN 0954-6820.

LAVIN, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, 2014. ISSN 0092-8674.

LEE, S. J. et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1898-1901, 2002. ISSN 0036-8075.

LEFÈVRE, L. et al. PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12828, 2010. ISSN 1932-6203.

LIU, Y. et al. Fish oil enhances intestinal integrity and inhibits TLR4 and NOD2 signaling pathways in weaned pigs after LPS challenge. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 11, p. 2017-2024, 2012. ISSN 0022-3166.

MCCLELLAND, S. et al. Conjugated linoleic acid suppresses the migratory and inflammatory phenotype of the monocyte/macrophage cell. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 1, p. 96-102, 2010. ISSN 0021-9150.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001. ISSN 1474-1733.

MICKLEBOROUGH, T. D. et al. Eicosapentaenoic acid is more effective than docosahexaenoic acid in inhibiting proinflammatory mediator production and transcription from LPS-induced human asthmatic alveolar macrophage cells. **Clinical nutrition**, v. 28, n. 1, p. 71-77, 2009. ISSN 0261-5614.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000. ISSN 0022-1767.

MISHARIN, A. V.; SABER, R.; PERLMAN, H. Eosinophil contamination of thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cultures skews the functional readouts of in vitro assays. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 2, p. 325-331, 2012. ISSN 0741-5400.

MONCADA, S.; HIGGS, E. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European journal of clinical investigation**, v. 21, n. 4, p. 361-374, 1991. ISSN 1365-2362.

MORRIS, S. M. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6, p. 1602S-1609S, 2007. ISSN 0022-3166.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986. ISSN 0022-1767.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008. ISSN 1474-1733.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, 2014. ISSN 1074-7613.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011. ISSN 1474-1733.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992. ISSN 0892-6638.

NEEDLEMAN, P. et al. Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 76, n. 2, p. 944-948, 1979. ISSN 0027-8424.

NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 701-738, 1999. ISSN 0732-0582.

NELSON, M. P. et al. IL-33 and M2a alveolar macrophages promote lung defense against the atypical fungal pathogen *Pneumocystis murina*. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 4, p. 2372-2381, 2011. ISSN 0022-1767.

NIEVES, D.; MORENO, J. J. Effect of arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism on RAW 264.7 macrophage proliferation. **Journal of cellular physiology**, v. 208, n. 2, p. 428-434, 2006. ISSN 1097-4652.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49-61, 2014. ISSN 1074-7613.

OLIVER, E. et al. Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1192-1200, 2012. ISSN 0955-2863.

PAPADOPOULOS, G. et al. Macrophage-specific TLR2 signaling mediates pathogen-induced TNF-dependent inflammatory oral bone loss. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1148-1157, 2013. ISSN 0022-1767.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in lipid research**, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001. ISSN 0163-7827.

PATTERSON, E. et al. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0724.

PERDIGUERO, E. G.; GEISSMANN, F. The development and maintenance of resident macrophages. **Nature immunology**, v. 17, n. 1, p. 2-8, 2016. ISSN 1529-2908.

PERRELLA, M. A. et al. Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 beta in rat smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14595-14600, 1994. ISSN 0021-9258.

PLATT, A. M.; MOWAT, A. M. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. **Immunology letters**, v. 119, n. 1, p. 22-31, 2008. ISSN 0165-2478.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews immunology**, v. 9, n. 4, p. 259-270, 2009. ISSN 1474-1733.

RAES, G. et al. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 9, n. 3, p. 151-159, 2002. ISSN 1044-6672.

RAINER, L.; HEISS, C. J. Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 6, p. 963-968, 2004. ISSN 0002-8223.

RAO, K. M. K. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 3, n. 1, p. 27-58, 2000. ISSN 1093-7404.

RATH, M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. 2014.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998. ISSN 0028-0836.

RIVOLLIER, A. et al. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20101387, 2012. ISSN 0022-1007.

RODRIGUES, M. M.; RIBEIRÃO, M.; BOSCARDIN, S. B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunology Letters**, v. 73, n. 1, p. 43-50, 2000. ISSN 0165-2478.

RÓSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015. ISSN 0962-9351.

RUSSELL, C. D.; SCHWARZE, J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 166-173, 2014. ISSN 1365-2567.

SARGI, S. et al. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the production of prostaglandin E2 and nitric oxide during experimental murine paracoccidioidomycosis. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

SCHILLING, T.; MIRALLES, F.; EDER, C. TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages. **J Cell Sci**, v. 127, n. 21, p. 4561-4566, 2014. ISSN 0021-9533.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n- 3 and n- 6 fatty acids. **Progress in lipid research**, v. 47, n. 2, p. 147-155, 2008. ISSN 0163-7827.

SCHOENIGER, A. et al. The impact of membrane lipid composition on macrophage activation in the immune defense against *Rhodococcus equi* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 11, p. 7510-7528, 2011.

SCHOENIGER, A.; FUHRMANN, H.; SCHUMANN, J. LPS-or *Pseudomonas aeruginosa*-mediated activation of the macrophage TLR4 signaling cascade depends on membrane lipid composition. **PeerJ**, v. 4, p. e1663, 2016. ISSN 2167-8359.

SCHROIT, A.; GALLILY, R. Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. **Immunology**, v. 36, n. 2, p. 199, 1979.

SCHUMANN, J. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. **European journal of pharmacology**, v. 785, p. 18-23, 2016. ISSN 0014-2999.

SCHUMANN, J. et al. Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e24066, 2011. ISSN 1932-6203.

SEKI, H.; TANI, Y.; ARITA, M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 89, n. 3, p. 126-130, 2009. ISSN 1098-8823.

SETHI, A.; SINGH, M.; ARORA, R. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease events. **JAMA**, v. 309, n. 1, p. 27-27, 2013. ISSN 0098-7484.

SETHI, S. et al. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR α . **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1340-1346, 2002. ISSN 0006-4971.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **The American journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 3, p. 438-463, 1991. ISSN 0002-9165.

_____. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3, p. 560s-569s, 1999. ISSN 0002-9165.

SKULADOTTIR, I. H.; PETURSDOTTIR, D. H.; HARDARDOTTIR, I. The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on TNF- α and IL-10 secretion by murine peritoneal cells in vitro. **Lipids**, v. 42, n. 8, p. 699-706, 2007. ISSN 0024-4201.

SMYTHIES, L. E. et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 1, p. 66-75, 2005. ISSN 0021-9738.

SOLBACH, W. et al. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. **Behring Institute Mitteilungen**, n. 88, p. 230-238, 1991. ISSN 0301-0457.

STACHOWSKA, E. et al. Conjugated linoleic acids can change phagocytosis of human monocytes/macrophages by reduction in Cox-2 expression. **Lipids**, v. 42, n. 8, p. 707, 2007. ISSN 0024-4201.

STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 1, p. 287-292, 1992. ISSN 0022-1007.

STEPPAN, C. M. et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 2, p. 502-506, 2001. ISSN 0027-8424.

SUBBAIAH, P. V. et al. Incorporation profiles of conjugated linoleic acid isomers in cell membranes and their positional distribution in phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 1, p. 17-24, 2011. ISSN 1388-1981.

TAKEDA, G. et al. Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in Trypanosoma cruzi infected C57BL/6 mice. **Acta tropica**, v. 60, n. 3, p. 215-219, 1995. ISSN 0001-706X.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897-901, 2003. ISSN 1471-0072.

TAYLOR, B.; ALARCON, L.; BILLIAR, T. Reviews-Inducible Nitric Oxide Synthase in the Liver: Regulation and Function. **Biochemistry-New York-English Translation of Biokhimiya**, v. 63, n. 7, p. 766-781, 1998. ISSN 0006-2979.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 128, n. 3, p. 415-435, 1968. ISSN 0022-1007.

VODOVOTZ, Y. et al. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 605-613, 1993. ISSN 0022-1007.

WAHLE, K. W.; HEYS, S. D.; ROTONDO, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? **Progress in lipid research**, v. 43, n. 6, p. 553-587, 2004. ISSN 0163-7827.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; BEREZINSKA, M.; NOWAK, J. Z. PUFAs: structures, metabolism and functions. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 6, p. 931-41, 2015.

WIRTH, J.; KIERSZENBAUM, F.; ZLOTNIK, A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). **Immunology**, v. 66, n. 2, p. 296, 1989.

WONG, S. W. et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384-27392, 2009. ISSN 0021-9258.

WRIGHT, M. B. et al. Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists. **Molecular endocrinology**, v. 28, n. 11, p. 1756-1768, 2014. ISSN 0888-8809.

XIA, Y.-F. et al. NF- κ B activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 4, p. 851-856, 2001. ISSN 0006-291X.

XIE, Q.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4705-4708, 1994. ISSN 0021-9258.

XUE, B. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids antagonize macrophage inflammation via activation of AMPK/SIRT1 pathway. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e45990, 2012. ISSN 1932-6203.

YONA, S. et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79-91, 2013. ISSN 1074-7613.

YU, Y.; CORRELL, P.; HEUVEL, J. V. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1581, n. 3, p. 89-99, 2002. ISSN 1388-1981.

ZANLUQUI, N. G.; WOWK, P. F.; PINGE FILHO, P. Macrophage Polarization in Chagas Disease. 2015. ISSN 2155-9899.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Monocyte subsets in man and other species. **Cellular immunology**, v. 289, n. 1, p. 135-139, 2014. ISSN 0008-8749.