

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Vinícius Dantas Martins

**A obesidade em camundongos C57BL/6 altera as células da imunidade inata
na infecção por *Leishmania major***

Belo Horizonte
2019

Vinicius Dantas Martins

**A obesidade em camundongos C57BL/6 altera as células da imunidade inata
na infecção por *Leishmania major***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Tatiani Uceli Maioli
Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Belo Horizonte

2019

043

Martins, Vinicius Dantas.

A obesidade em camundongos C57BL/6 altera as células da imunidade inata na infecção por *Leishmania major* [manuscrito] / Vinicius Dantas Martins. – 2019.

81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiani Uceli Maioli. Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Caetano de Faria.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Bioquímica e Imunologia.

1. Biologia e Imunologia. 2. Obesidade. 3. Infecção. 4. *Leishmania major*. 5. Resposta imune. I. Maioli, Tatiani Uceli.. II. Faria, Ana Maria Caetano de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Instituto de Ciências Biológicas



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia (CBA/UFMG)
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE VINICIUS DANTAS MARTINS. Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de 2019 às 09h 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 "A obesidade em camundongos C57BL/6 altera as células da imunidade inata na infecção por *Leishman major*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Tatiani Uceli Maioli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Gustavo Batista de Menezes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Thiago de Castro Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 22 de fevereiro de 2019.


 Dr. Gustavo Batista de Menezes (UFMG)


 Dr. Thiago de Castro Gomes (UFMG)


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


 Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (UFMG)

Prof.^o Jader dos Santos Cruz
 Sub-Coordenador do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha orientadora Tatiani Maioli por todo apoio desde a minha aceitação no laboratório em 2013. Por proporcionar excelentes conversas científicas ou casuais, mas também por oferecer um ombro em momentos difíceis. Obrigado pelas broncas, pelas estojadas. Mas principalmente, obrigado por dar forças e me motivar, sempre apoiando as minhas ideias, dando sempre condições de realiza-las sempre com muito aconselhamento e planejamento. Saiba que sempre estarei disposto a ajudar quando precisar, dando o meu melhor.

Outra pessoa que sou imensamente grato é a minha outra orientadora, que também considero como primeira. Obrigado Ana, por abrir as portas do laboratório para mim, e por sempre estar disponível para conversar sobre o meu projeto, sempre dando excelentes conselhos e ajudando a delinear os experimentos. Nunca esquecerei também que você proporcionou a conversa com o Juan Lafaille. Esse momento abriu novos horizontes e me instigou bastante. Obrigado!

Gostaria de agradecer também a professora Leda, que sempre me deu suporte, abrindo as portas para as discussões científicas no LAGI, que estão me ajudando demais. Além disso, obrigado por arranjar as reuniões com David Sacks e Nathan Peters, que sem dúvida me motivaram bastante.

Gostaria de agradecer em especial ao Léo, a Lícia e a Mari muito pela amizade, mas também pela fundamental colaboração. Em praticamente todos os experimentos vocês tiveram comigo e foram mais que essenciais na minha jornada. Não menos especiais, gostaria também de agradecer a recém contratada do LIB, Sara “minha IC” e ao Matheus Eustáquio pela excelente ajuda.

Não podia deixar de agradecer também ao Maurinho pelas inúmeras caronas, pela contagem de células e obviamente pela amizade sincera.

Claramente todos do LIB são especiais. Obrigado a Mini-mari, Naty, Lu, Ciça, Sarah, Ju, Bela, Pri, Helder, Caixeta, Carlos, Camila, Mari Naves, Fernanda, Carol, Lucas Haniel, Henrique. Espero continuar trabalhando com vocês e continuar sendo feliz no ambiente de trabalho.

Aos membros do LAGI também fica o meu agradecimento pelo sempre bom acolhimento.

Um agradecimento especial à Ildinha e ao Hermes que sempre dão uma solução para os nossos problemas e cuidam dos animais com muito respeito e com uma dedicação única. Em especial aos cafezinhos da Ildinha que propiciam o encontro do departamento e a amenizam o nosso dia.

Obrigado também a dona Carminha, por ser uma mãezona e estar sempre cuidando do nosso Lab.

Obrigado aos meus amigos de bases e amigos da vida. Não importa o quão cheia sua cabeça está, sempre há espaço para uma cerveja com amigos.

Obrigado as agências de fomento: CNPq, CAPES e Fapemig.

Por fim, o mais importante. Obrigado a minha família. Obrigado a mãe, pai, Tati e Gabi. Em especial um obrigado a minha mãe e meu pai que sempre me apoiaram, não importa o momento. Sempre dão aval para os meus sonhos e não medem esforços para ajudar. A presença de vocês é essencial para a minha trajetória. Sou imensamente grato por tudo que fazem e vem fazendo por mim.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde pública relacionado a distúrbios metabólicos e imunológicos. Ela também está associada à inflamação de baixo grau e geralmente leva ao aumento na suscetibilidade a doenças infecciosas. Em trabalho prévio, mostramos que camundongos C57BL/6 com obesidade induzida por dieta eram mais suscetíveis à infecção por *Leishmania major*. Neste estudo, buscamos entender melhor o mecanismo envolvido no aumento de suscetibilidade dos animais obesos. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta hipercalórica contendo alto teor de lipídeos (manteiga) e carboidratos (açúcar refinado) chamada dieta HSB (*high sugar butter*) ou com dieta controle (AIN93-G). Após essas 12 semanas, os camundongos mostravam diferença no ganho de peso e foram infectados na orelha com formas promastigotas de *L. major*. Confirmamos inicialmente que a obesidade resultou em aumento do tamanho das lesões e da carga parasitária após 8 semanas de infecção. Para avaliar o efeito da obesidade na imunidade inata durante a infecção por *L. major*, as frequências de neutrófilos (Ne), monócitos (Mo) e macrófagos (M ϕ) do sangue, tecido adiposo, baço e orelha foram analisadas por citometria de fluxo antes, 2 dias e 8 semanas após a infecção. Antes da infecção, os animais obesos apresentaram maior frequência de Ne, Mo e M ϕ no sangue e maior frequência de M ϕ e Mo no tecido adiposo do que os camundongos controle. Não observamos qualquer diferença entre as populações de células do baço e apenas alguns leucócitos foram encontrados na orelha antes da infecção. Dois dias após a infecção, não houve alteração no perfil das células analisadas no baço e no tecido adiposo. Camundongos obesos infectados apresentaram menor infiltrado de Ne na orelha infectada quando comparados com os camundongos do grupo controle infectados. Apesar de apresentar mais Ne e Mo circulantes, os animais obesos não conseguiram recrutar células inflamatórias para a pele 2 dias após a infecção por *L. major*. No período crônico da infecção (8 semanas), observamos um aumento de células mieloides (Mo e M ϕ) com assinatura anti-inflamatória no baço (CD11b+CD206+) e no sítio da infecção (CD11b+Ly6C^{int}CD206+), sugerindo que a obesidade altera o perfil de células na lesão e eleva a frequência de macrófagos que podem ter um perfil ineficaz no controle da *L. major* compatíveis com a resistência ao parasito.

Palavras-chaves: obesidade, infecção, *Leishmania major*, resposta imune

ABSTRACT

Obesity is a health problem related to metabolic and immunological disorders. It is also related to low grade inflammation and lead to increased susceptibility to infectious diseases. In our previous work, we have shown that C57BL/6 mice with diet induced obesity were more susceptible to *L. major* infection. In this study, we sought to understand the mechanism involved in this increasing susceptibility in obese animals. C57BL/6 mice were fed a high-calorie diet containing high-fat lipids (butter) and carbohydrates (refined sugar) called HSB (high sugar butter) or control diet (AIN93-G) for 12 weeks. After 12 weeks, the mice showed difference in weight gain and were infected with *Leishmania major* promastigotes. First, we confirmed that obesity lead to increasing lesion size and higher parasite burden after 8 weeks of infection. To assess the effect of obesity on innate immunity during *L. major* infection, neutrophil (Ne), monocytes (Mo) and macrophages (M ϕ) frequencies from blood, adipose tissue, spleen and ears were analyzed using flow cytometry after 2 days and 8 weeks post infection. Before infection, obese mice had a higher frequency of Ne, Mo and M ϕ in the blood and a higher frequency of M ϕ and Mo in the adipose tissue than the control mice. We did not observe any difference between populations of spleen cells and only a few leukocytes were found in the ear before infection. Two days after infection, there was no change in the cells analyzed in the spleen and adipose tissue. Obese infected mice had a smaller Ne infiltrate in the infected ear when compared to infected control mice. Despite presenting more circulating Ne and Mo, obese animals were unable to recruit the cells into the skin after 2 days of infection. In the chronic period of infection (8 weeks), we observed an increase in myeloid cells (Mo and M ϕ) with anti-inflammatory signature in the spleen (CD11b+ CD206+) and at the site of infection (CD11b+Ly6CintCD206+), suggesting that obesity changes profile of cells in the lesion and elevates the frequency of macrophages that may have an ineffective profile in the control of *L. major* compatible with resistance to the parasite.

Key-words: obesity, infection, *Leishmania major*, immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo do desenvolvimento da resposta Th1 e hipótese.....	30
Figura 2	Desenho experimental.....	35
Figura 3	Estratégia de gating para análise de células extraídas da orelha....	38
Figura 4	Estratégia de gating utilizada para análise de macrófagos de tecido adiposo.....	39
Figura 5	Estratégia de gating utilizada para identificar e caracterizar neutrófilos e monócitos do sangue	41
Figura 6	Estratégia de gating utilizada para identificar e caracterizar células extraídas do baço.....	42
Figura 7	Avaliação da medida de lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>	46
Figura 8	Frequência de células FOXP3+ no baço e linfonodos drenantes de animais obesos e controle infectados ou desafiados com PBS.....	47
Figura 9	Avaliação da frequência de neutrófilos, diferentes subtipos de monócitos e células residentes na orelha 2 dias após a infecção.....	49
Figura 10	Avaliação da frequência de neutrófilos e monócitos no sangue 2 dias após a infecção.....	51
Figura 11	Avaliação da frequência de neutrófilos e monócitos no tecido adiposo e baço 2 dias após a infecção.....	53
Figura 12	Avaliação da frequência de neutrófilos, diferentes subtipos de monócitos e células residentes na orelha 8 semanas após a infecção por <i>L. major</i>	55
Figura 13	Avaliação da frequência de neutrófilos, macrófagos e monócitos no tecido adiposo, baço e sangue 8 semanas após a infecção.....	57
Figura 14	Avaliação da frequência de células CD11b+TLR-4+, LAP+ e CD206+ em células CD11b+ no baço de camundongos obesos.....	59
Figura 15	Avaliação da frequência de células CD206+ da orelha, 8 semanas após a infecção.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ingredientes das dietas controle e hipercalórica.....	32
Tabela 2	Composição nutricional (macronutrientes) das dietas controle e hipercalórica.....	33
Tabela 3	Titulações dos anticorpos utilizados para marcação de citometria de fluxo.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – microgramas

µL – microlitros

ABTS – *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*

AIN 93G – dieta padrão para roedores

AKt – proteína cinase B

AMPC – adenina monofosfato cinase

BHT – Hidroxitolueno butilado

BSA – albumina soro bovina

C57BL/6 – camundongo C57 *black* 6

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CO₂ – gás carbônico

CRP - proteínas reativas C

CCR2 - Receptores de quimiocinas CC

CCL2 – Ligante de quimiocinas 2

dL – decilitro

DNA – ácido desoxirribonucleico

FFA – ácidos graxos livres

EDTA

H1N1 – vírus influenza

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HIF1α – Fator indutor de hipóxia

HDL – lipoproteína de alta densidade

HSB – dieta indutora de obesidade

IFN-α/β/γ – interferon *alfa/beta/gama*

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IMC – índice de massa corporal

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

JAK2–STAT

Kcal – quilocalorias

Kg/m² – quilogramas por metro ao quadrado

L. major – *leishmania major*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LPS – lipopolissacarídeo

M1 e M2 – macrófagos do tipo M1 ou do tipo 2

mg – miligramas

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

NF-kB – fator nuclear *kappa* B

NK – Natural *Killer*

nm – nanômetros

NO – óxido nítrico

°C – graus Celsius

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – ortofenileneamina

PPAR- γ - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PCR – proteína C reativa

RNA – ácido ribonucleico

RPMI – meio para cultura de células desenvolvido pelo “Institute Roswell Park Memorial” - (RPMI)

RBC - hemácias

STAT – sinal de transdução e ativação de transcrição

TGF- β – fator de transformação de crescimento *beta*

Th1 – células T *helper* tipo 1

Th2 – células T *helper* tipo 2

Treg – células T reguladoras

TLR – *toll like receptor*

TNF – fator de necrose tumoral

UCP1 - proteína desacopladora mitocondrial

x g – giros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2.1 Obesidade e seus determinantes imunometabólicos	16
2.2 Relação da obesidade com doenças infecciosas e infecto-parasitárias	21
2.3 Leishmanioses	24
3 HIPÓTESE DE TRABALHO	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 Animais.....	32
5.2 Dieta indutora de obesidade	32
5.3 Parasito	33
5.4 Desenho experimental	34
5.5 Quantificações de parasitos na orelha	35
5.6 Citometria de fluxo.....	35
5.6.1 Extração e análise de células extraídas da orelha.....	36
5.6.2 Extração e análise de células extraídas do tecido adiposo	37
5.6.3 Extração e análise de células extraídas do sangue	39
5.6.4 Extração e análise de células do baço	41
5.6.5 Marcação de células para citometria de fluxo.....	42
6 RESULTADOS	44
6.1 A obesidade aumentou a suscetibilidade à infecção por <i>L. major</i> em camundongos C57BL/6	44
6.2 A frequência de células Treg CD4+ Foxp3+ não se alterou em camundongos obesos infectados com <i>L. major</i>	46
6.3 A obesidade resultou em diminuição na frequência de neutrófilos na orelha de camundongos infectados 2 dias após a infecção	47

6.4 A obesidade induziu aumento na frequência de neutrófilos circulantes dois dias após a infecção.	50
6.5 A obesidade induziu o aumento do número e da frequência de macrófagos e monócitos no tecido adiposo.....	52
6.6 Os monócitos foram as células predominantes nas lesões 8 semanas após a infecção com <i>L. major</i> em camundongos obesos e controles.	54
6.7 Variações no perfil de células do sangue, do tecido adiposo e do baço 8 semanas após a infecção com <i>L. major</i>	56
6.8 A obesidade induzida pela dieta HSB resultou no aumento da frequência de células com perfil anti-inflamatório nos baços de camundongos C57BL/6.	58
6.9 Camundongos obesos infectados com <i>L. major</i> apresentam maior frequência de macrófagos CD11b+CD206+ nas lesões	60
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÃO	71
9 PERSPECTIVAS	72
10 REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	81

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo. O aumento massivo de pessoas obesas ao longo dos anos, é resultado de um mundo onde as pessoas cada dia mais se alimentam mal e não praticam exercícios. Hoje, já se sabe que é uma condição considerada fator de risco para o surgimento de diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, apneia do sono, osteoartrite, câncer, e até doenças infecciosas. A expansão do tecido adiposo resulta em quebra da homeostasia corporal e em alterações significativas no sistema imune. Essas alterações decorrentes da obesidade também possuem impacto enorme na resposta do indivíduo frente a infecções (WILLIAMS et al., 2015).

Dentre as infecções endêmicas de importância no Brasil estão as leishmanioses. Elas representam um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *leishmania* que são transmitidas pela picada de insetos da subfamília *Phlebotominae*. Entre as formas clínicas da doença, destacam-se a forma visceral e cutânea. A leishmaniose cutânea é uma doença que persiste na população ao longo das décadas, principalmente por não haver muito investimento em campanhas de conscientização, medidas profiláticas e de tratamento. Estima-se que, todos os anos, cerca de um milhão de pessoas entram em contato com o parasito podendo ou não desenvolver a doença (REITHINGER et al., 2007).

Em um cenário onde a obesidade atinge níveis extremamente altos em todo o mundo e a incidência de leishmaniose cutânea persiste elevada no país ao longo dos anos, torna-se relevante o estudo da relação entre as duas condições. Assim, neste estudo, procuramos entender como as alterações no sistema imune decorrentes da obesidade impactam na resposta imune frente ao parasito.

2.1 Obesidade e seus determinantes imunometabólicos

Obesidade e sobrepeso são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como qualquer acúmulo anormal ou excessivo de gordura que podem ser prejudiciais à saúde. Para humanos, o índice mais utilizado para detecção da obesidade é o índice de Massa Corporal (IMC), definido como o peso do indivíduo em quilos dividido pelo quadrado da sua altura em metros (kg/m^2). Indivíduos com valores de IMC entre 25 a $29,9\text{kg}/\text{m}^2$ são considerados com sobrepeso, enquanto indivíduos com IMC igual ou maior a $30\text{kg}/\text{m}^2$ são considerados obesos (WHO, 2018). A ocorrência de pessoas com sobrepeso que não apresentam as comorbidades associadas à obesidade, bem como de pessoas com peso normal, mas que apresentam complicações metabólicas, indicam que o IMC, por si só, não define bem a condição de obesidade. O que de fato define o excesso de peso como sendo prejudicial à saúde são as alterações metabólicas decorrentes dessa condição junto com o acúmulo de tecido adiposo. Sendo assim, o aumento de gordura associado a outros parâmetros, como o aumento da resistência à insulina, o aumento da glicemia, o aumento da glicemia de jejum e dos níveis de proteínas reativas C (CRP), diminuição de HDL são alguns dos fatores utilizados para definir a obesidade associada à síndrome metabólica (WILDMAN et al., 2008).

A obesidade é um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo acometendo, em 2016, cerca de 39% dos homens e mulheres no mundo (DI CESARE et al., 2016). A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões com obesidade. Ainda mais alarmante, a obesidade infantil é crescente afetando mais de 11% das crianças em todo mundo (WHO, 2018). No Brasil e no mundo, a obesidade tem crescido desde os anos 70, reflexo de uma mudança de hábitos alimentares e de estilo de vida da população, na qual o sedentarismo é prevalente e o consumo de alimentos industrializados, ricos em açúcar e gorduras saturadas toma o espaço de uma alimentação saudável, balanceada e natural. Segundo o Vigitel (2015), todas as capitais brasileiras, incluindo Brasília, apresentaram um percentual de homens (≥ 18 anos) com excesso de peso acima dos 50% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Esse distúrbio tem causalidade multifatorial, porém o que define de fato o excesso de peso é o balanço entre o consumo e o gasto calórico, de modo que, quando o consumo alimentar é superior ao aporte energético aplicado para realização

das funções metabólicas vitais se observa a condição de ganho excessivo de peso que pode progredir para obesidade. Porém, a etiologia da obesidade é complexa e envolve fatores socioeconômicos, psicológicos, genéticos, dentre outros (HRUBY, ADELA; HU, 2015).

A obesidade é um fator de risco para a vida humana e as síndromes a ela associadas têm impacto relevante na taxa mundial de mortalidade. Diversos distúrbios metabólicos, cardiovasculares e inflamatórios são associados ao excesso de peso como, por exemplo, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, síndrome metabólica, câncer, doenças respiratórias, esteatose hepática, síndrome do ovário policístico, infertilidade, dislipidemias, neoplasias, acidente vascular cerebral, dentre outras (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

Muitas das doenças associadas à obesidade ocorrem a partir de modificações no tecido adiposo. Esse órgão, antes estudado como um tecido inerte e responsável apenas pelo acúmulo de lipídios, foi mais recentemente reconhecido como fonte produtora de inúmeras substâncias genericamente chamadas de adipocinas (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). A classificação do tecido adiposo varia de acordo com sua localização, com a forma que a gordura é armazenada no citoplasma da célula e com o número de mitocôndrias no adipócito. Referente à localização, comumente se define como visceral ou subcutâneo. O local onde o tecido adiposo é majoritariamente depositado influi na função metabólica do tecido de modo que, normalmente, o acúmulo visceral de gordura tende a ser mais prejudicial à saúde do que o acúmulo subcutâneo (GESTA; TSENG; KAHN, 2007). Os tipos de tecido adiposo são o branco e o marrom. O tecido adiposo branco é depositado em vários locais, porém, é normalmente encontrado no depósito de gordura visceral. No depósito subcutâneo também predomina o tecido adiposo branco, porém neste há menor infiltrado celular em relação ao depósito visceral (CANCELLO et al., 2006). Já o tecido adiposo marrom é encontrado principalmente em torno dos sítios interescapular, axilar, paravertebral e perirrenal (PARK; KIM; BAE, 2014). Tanto o tecido adiposo branco quanto o marrom contribuem para a atividade metabólica e para o controle da homeostasia do organismo. O tecido adiposo branco armazena lipídeos e é um importante órgão secretor produzindo citocinas e adipocinas (FRAYN et al., 2003). Já o tecido marrom, além de armazenar lipídios, é fundamental para manutenção da temperatura corporal em um processo denominado termogênese

dependente da proteína desacopladora mitocondrial (UCP1) (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Com o estado de obesidade, o tecido adiposo expande-se e, conseqüentemente, a produção de adipocinas é modificada. Em condições de equilíbrio, as funções metabólicas do tecido adiposo são reguladas e influenciam o funcionamento de diversos órgãos do corpo. As adipocinas atuam diretamente no sistema imune promovendo alterações fisiológicas celulares que conferem proteção a diversas disfunções metabólicas. Com a condição de obesidade, há a ruptura dessa homeostasia, caracterizada pela produção desbalanceada de diversas substâncias, o que pode ocasionar um estado de inflamação crônica de baixa intensidade que muitas vezes está associado à síndrome metabólica (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

Os adipócitos são as principais células que compõe o tecido adiposo. Além dos adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune também fazem parte desse tecido. A reciclagem de adipócitos é mantida ao longo da vida por um equilíbrio entre a adipogênese e a apoptose de adipócitos. Uma fonte de pré-adipócitos é necessária para sustentar esse ciclo. A sinalização para a adipogênese está relacionada com o fator de transcrição PPAR- γ e a sensibilidade a ácidos graxos livres (FFA) por diversos receptores (VISHVANATH et al., 2016). O número total de adipócitos se estabelece majoritariamente durante a infância e a adolescência, porém o aumento em número de adipócitos (hiperplasia) pode ocorrer também durante a vida adulta (KULENKAMPFF; WOLFRUM, 2018; STAFEEV et al., 2018). Em condições homeostáticas, os adipócitos possuem alta plasticidade, no entanto, com o ganho de peso, ocorre a expansão física da célula devido ao acúmulo de lipídios (hipertrofia) induzindo o remodelamento da matriz extracelular, o que torna os adipócitos mais fibróticos e rígidos pelo acúmulo excessivo de colágeno (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011).

Em situações de acúmulo excessivo de lipídios, o tecido adiposo, de tanto se expandir, começa a se tornar disfuncional e incapaz de acumular gordura gerando um ambiente rico em FFA livres que não são armazenados, podendo levar a situações de acúmulo ectópico de gordura, principalmente no fígado. Esse processo, além de acelerar a progressão de falha no fígado, está associado com o surgimento de complicações metabólicas, além de exemplificar como a obesidade pode atuar na quebra da homeostasia de um órgão vital do corpo (KHAN et al., 2009).

Em 1993, um importante estudo de Hotamisligil deu novo enfoque para a obesidade e o tecido adiposo. Foi o primeiro estudo em que se demonstrou que adipócitos expressavam o fator de necrose-tumoral (TNF- α), importante citocina classicamente caracterizada como citocina pró-inflamatória (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Além disso, detectou-se que a obesidade e a resistência à insulina elevavam a expressão de TNF- α . Essa citocina é capaz de ativar muitas vias relacionadas com a inflamação, dentre elas, a do fator de transcrição NF κ B, o qual estimula a diferenciação de macrófagos inflamatórios e posteriormente de células T *helper* do tipo 1 (Th1) (SCHUTZE et al., 1992). Dentre suas várias funções, pode-se destacar sua capacidade citotóxica, de indução de apoptose celular, de liberação de óxido nítrico (NO) e de ativação da lipólise. Além do mais, o TNF- α atua inibindo a expressão celular de GLUT4, o qual implica em aumento da glicemia e na concentração de FFA no sangue, fatores fundamentais para a resistência à insulina (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011). Essa associação entre a obesidade e o aumento da expressão de TNF- α foi determinante para definir a visão atual de que a obesidade é responsável por estabelecer um ambiente crônico e inflamatório que teria grande impacto nas comorbidades frequentemente associadas com a ela.

A descoberta da leptina estabeleceu de vez o tecido adiposo como um importante órgão endócrino (ZHANG et al., 1994). Trata-se de um hormônio produzido no tecido adiposo cuja concentração sanguínea corresponde indiretamente à massa do tecido, de modo que obesos possuem elevadas concentrações desse hormônio. A leptina é um dos principais conectores entre tecido adiposo e sistema nervoso central visto que sinaliza, via receptores específicos através da cascata da JAK2-STAT, para a indução de processos como saciedade, gasto energético, pressão sanguínea e inflamação acentuada (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

Estudos antigos e recentes propiciaram modelos de animais que desenvolvem espontaneamente obesidade como camundongos *knockouts* para o gene da leptina (*ob/ob*) e *knockouts* para o receptor da leptina (*db/db*), os quais reproduzem um fenótipo de obesidade mórbida e diabetes tipo 2. Tais modelos foram essenciais para definições que ajudaram a estabelecer melhor a função do tecido adiposo e das suas alterações no contexto da obesidade (FREDERICH et al., 1995; JUNG; NAM; SUH, 2016).

Com a redefinição do conceito da obesidade e do papel do tecido adiposo, muitas outras descobertas emergiram no campo. A adiponectina, por exemplo,

também é produzida exclusivamente no tecido adiposo. Essa proteína está associada com efeitos anti-inflamatórios e aumento da sensibilidade a insulina (HOLLAND et al., 2010). Sendo assim, o tecido adiposo de indivíduos magros secreta maiores níveis de adiponectina, a qual atua na sensibilidade à insulina e no metabolismo de glicose, sendo uma das principais adipocinas que contribuem para o estabelecimento da homeostasia em pessoas saudáveis.

O tecido adiposo em estado de homeostasia apresenta várias células do sistema imune, principalmente células do sistema imune inato. As células que compõem o tecido adiposo são: macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T, entre outras (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013). No microambiente do tecido adiposo de obesos, os adipócitos repletos de lipídeos sofrem apoptose, liberando conteúdo intracelular, incluindo FFA e LPS. Essa expansão de adipócitos, com perda de função e morte celular, acompanha-se de uma vascularização ineficaz do tecido resultando em redução no aporte de oxigênio para as células e maior expressão do fator de transcrição HIF1 α , sensor de hipóxia (HE et al., 2011). Deste modo, o perfil celular e secretório exibido pelo tecido adiposo é totalmente alterado, resultado de uma mudança no estado nutricional,

Dentre as células do sistema imune mais abundantes no tecido adiposo de animais obesos, estão os monócitos e diferentes subtipos de macrófagos (CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013). A literatura descreve que, em indivíduos saudáveis, os macrófagos do tecido adiposo apresentam um perfil mais regulador, com maior produção de citocinas como IL-4 e IL-10 (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Com a obesidade, o número de células do sistema imune no tecido adiposo, principalmente macrófagos, torna-se cerca de 30% maior do que em indivíduos eutróficos (WEISBERG et al., 2003). Essas células formam estruturas em coroa (*crown-like-structures*), circundando adipócitos mortos e fagocitando lipídios, tornando os macrófagos do tecido adiposo células muito maiores do que os macrófagos de outros tecidos (CINTI et al., 2005). Grande parte da literatura aponta para uma mudança fenotípica dessas células. Esses macrófagos assumiriam um caráter mais inflamatório, já que entrariam em contato com estímulos como LPS e FFA, sendo capazes de secretar citocinas como TNF- α , 1L-1 β e IL-6 (GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). No entanto, essa visão de que o perfil de macrófagos é alterado drasticamente de um perfil regulador para um perfil inflamatório tem sido questionada. De fato, parece que a obesidade tende a aumentar

a produção de citocinas de modo geral, como o TNF- α , independentemente do seu papel inflamatório ou não (YAN et al., 2014).

Recentemente, a produção de IL-17, uma citocina associada com recrutamento de neutrófilos e com efeitos pró e anti-inflamatórios, tem sido caracterizada em modelos de obesidade, sendo demonstrado que sua produção está aumentada em indivíduos e camundongos obesos (ENDO et al., 2015; MAIOLI et al., 2018). Além disso, se descreve que no tecido adiposo de camundongos magros, predomina-se a produção de IL-10, havendo um aumento na população de células T reguladoras (Tregs) no local (MAIOLI et al., 2016). Seguindo a mesma ideia de mudança fenotípica, durante a obesidade, as células T também seriam induzidas para um fenótipo Th1 (STRISSEL et al., 2010).

Como discutido acima, a visão de que a obesidade está estritamente associada com células inflamatórias vem sendo questionada. Trabalhos recentes mostram que a ativação de células por estímulos abundantes no tecido adiposo não direciona para um perfil clássico de inflamação (KRATZ et al., 2014). Mais que isso, foi mostrado que as células do tecido adiposo que aumentam no contexto da obesidade apresentam perfil variável, sendo que a maior parte delas mantem excelente capacidade de adesão celular e são eficazes no processo de endocitose, características marcantes de macrófagos anti-inflamatórios (MOURA SILVA et al., 2018).

Levando em consideração que a obesidade traz alterações no perfil celular e secretório do tecido adiposo, torna-se mais compreensível que as alterações metabólicas e imunes decorrentes da obesidade se estendam a nível sistêmico resultando no surgimento de diversas síndromes e alterando a resposta imune a infecções. Todavia, o papel das células imunes do tecido adiposo e o seu impacto no sistema ainda é obscuro. Assim, o entendimento dos processos imunológicos que regulam a obesidade e vice-versa precisam ser melhor esclarecidos para a melhor compreensão do real impacto da obesidade na saúde humana.

2.2 Relação da obesidade com doenças infecciosas e infecto-parasitárias

A obesidade e a alteração do perfil celular e secretório causado por essa condição é associada com diversas complicações metabólicas. Os efeitos do excesso de adiposidade podem atingir diversos órgãos responsáveis pelo metabolismo, incluindo o fígado, cérebro, pâncreas e tecido adiposo. A quebra da homeostasia

induzida pelo aumento da adiposidade implica no surgimento de doenças como diabetes tipo 2 e muitas outras, contribuindo para patogênese da síndrome metabólica. Do mesmo modo, a partir do aumento de adipócitos, as células imunes podem alterar seu metabolismo lipídico ou a captação de glicose. Em conjunto, se observa uma série de efeitos sistêmicos que, como resultado, podem induzir o surgimento de doenças imunometabólicas que contribuem para o envelhecimento e o aumento na taxa de mortalidade global (HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008).

Os mecanismos pelos quais a obesidade afeta a resposta imune frente a diversos agentes infecciosos ainda não são bem compreendidos. Estudos com camundongos *ob/ob* foram os primeiros a demonstrar uma relação negativa entre obesidade e infecções bacterianas das vias aéreas, incluindo *Klebsiella pneumoniae* (MANCUSO et al., 2002) e *Mycobacterium tuberculosis* (WIELAND et al., 2005). Na maioria dos casos, o pior prognóstico é associado com a incapacidade de macrófagos em eliminar bactérias no órgão acometido devido à fagocitose prejudicada, o que leva a maior disseminação do microrganismo e ao aumento da mortalidade.

A deficiência de leptina implica em muitas alterações no sistema imune. Por outro lado, modelos de obesidade induzida por dieta em roedores tentam mimetizar a obesidade humana de maneira mais realista, no sentido de promover os efeitos metabólicos a partir da alteração no estado nutricional dos animais. Tem sido demonstrado que a obesidade induzida por dieta leva a um pior prognóstico na infecção pelo vírus *Influenza*. Camundongos obesos apresentaram maior taxa de mortalidade com diminuição dos níveis de importantes citocinas antivirais, como IFN- α e IFN- β , e redução concomitante na citotoxicidade de células NK, que são essenciais para o controle da infecção pelo H1N1 (KARLSSON; SHERIDAN; BECK, 2010). Estudos com *Staphylococcus aureus* e *Porphyromonas gingivalis* também observaram que a produção de citocinas inflamatórias e anticorpos específicos são menos eficientes em camundongos obesos. Os animais obesos infectados por *S. aureus* tiveram infecção óssea mais grave do que os animais magros, com aumento na taxa de mortalidade (FARNSWORTH et al., 2015). Na doença periodontal associada a *P. gingivalis*, a infecção foi mais grave em camundongos alimentados com dieta hipercalórica, a qual induziu lesão endotelial e acelerou parcialmente a apoptose de células endoteliais (AO et al., 2014). De modo geral, a produção desbalanceada de citocinas por indivíduos obesos parece ser prejudicial ao tecido e

insuficiente para ativar as células do sistema imune para o controle da maioria das doenças infecciosas causadas por bactérias e vírus.

Infecções por protozoários acometem milhões de pessoas no mundo. Normalmente são classificadas como doenças negligenciadas. Estas são infecções que persistem ao longo dos anos e, com o crescimento na incidência de obesidade na população, torna-se relevante o estudo da relação entre as duas condições. Ainda é pouco estudado como parasitos se comportam em um hospedeiro obeso e como a obesidade pode alterar a resposta imune frente a essas infecções. É bem descrito que o *Trypanosoma cruzi* é capaz de infectar e persistir no interior dos adipócitos (VERSIANI et al., 2011). O tecido adiposo pode ser considerado um local seguro para o parasito, já que se trata de um importante reservatório energético, que pode fornecer FFAs e lipídeos ao protozoário, possibilitando seu crescimento (TANOWITZ et al., 2017). As infecções por protozoários também podem causar efeitos sistêmicos no organismo, pois atuam modulando vias metabólicas do hospedeiro, como a do metabolismo de lipídios e glicose. A infecção aguda pelo *T. cruzi* pode induzir a lipólise na célula, sendo crucial para a sobrevivência do parasito (NAGAJYOTHI et al., 2012a). Esse evento altera o metabolismo lipídico nas células do hospedeiro, um processo mediado por citocinas inflamatórias e outras adipocinas que modificam o estado metabólico do hospedeiro e são capazes de interferir na homeostasia das células infectadas. Finalmente, a infecção por *T. cruzi* também desencadeia o aumento da respiração mitocondrial e a elevação da captação de glicose nas células infectadas (NAGAJYOTHI et al., 2012b).

O grupo de Tanowitz foi pioneiro nos estudos das interações entre o *T. cruzi* e o hospedeiro modificando seu metabolismo durante a doença de Chagas. Eles também foram os primeiros a estudar os efeitos da obesidade na resposta imune durante a infecção aguda por *T. cruzi*. Eles mostraram que camundongos *db/db* apresentavam alterações adversas durante a infecção pelo *T. cruzi*, caracterizadas por aumento da carga parasitária e grave reação inflamatória no coração devido ao aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α (NAGAJYOTHI et al., 2010). Curiosamente, utilizando dieta rica em gordura para induzir a obesidade e diabetes tipo 2, eles observaram resultados diferentes. Animais obesos apresentaram redução da mortalidade, menor parasitemia, redução na carga parasitária miocárdica e dano miocárdico menos grave durante a infecção (NAGAJYOTHI et al., 2014). No caso, parece que a obesidade induzida por dieta representa uma "obesidade mais

fisiológica" que leva à expansão dos adipócitos, um excelente sítio para a infecção por *T. cruzi*. No caso, é possível que o tecido adiposo sequestre parasitos que, de outra forma, iriam para o coração.

Alguns poucos estudos recentes que correlacionam a obesidade com diferentes tipos de infecções parasitárias, mostram que, na maioria das vezes, a obesidade tende a ser um fator de risco para essas infecções. Em estudo utilizando um modelo de obesidade induzida em camundongos neonatos através de injeções de glutamato monossódico (MSG), observou-se que camundongos obesos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* apresentaram dano cerebral grave devido ao aumento da produção das citocinas relacionadas à resposta Th1, como IL-12 e IFN- γ no encéfalo (DE CARVALHO et al., 2015). Além disso, a obesidade também foi identificada como um fator de risco para malária causada por *Plasmodium falciparum* em humanos (WYSS et al., 2017). Já em relação a leishmaniose visceral, foi demonstrado que a obesidade induzida por dieta HSB promoveu o aumento da suscetibilidade à doença, com aumento da carga parasitária visceral, do dano tecidual hepático, esplênico e maior inflamação caracterizada pela elevada produção sistêmica de TNF- α , IL-6 e IFN- γ durante a infecção por *L. chagasi* (SARNÁGLIA et al., 2016).

2.3 Leishmanioses

As leishmanioses compreendem doenças infecto-parasitárias causadas por organismos unicelulares pertencentes ao reino Protista, da ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. O vetor dos parasitos são insetos da subfamília *Phlebotominae* (Espécies de *Phlebotomus* no Velho Mundo e espécies de *Lutzomyia* no Novo Mundo). Apenas flebotomíneos fêmeas infectadas são capazes de transmitir o parasito, os quais são hospedeiros intracelulares obrigatórios que se desenvolvem em células do sistema fagocitário, principalmente monócitos e macrófagos (ALVAR et al., 2012).

Elas são consideradas doenças tropicais negligenciadas sendo endêmicas principalmente de regiões subtropicais de aproximadamente 100 países. Ainda se estima que cerca de 1 milhão de novos casos ocorrem todo ano e aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas com alguma espécie do parasito (ALVAR et al., 2012). O Brasil, junto com Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Costa Rica, Iran e Síria correspondem a 95% dos países onde novos casos

de leishmaniose são descritos (REITHINGER et al., 2007). No Brasil, acontecem cerca de 25.000 novos casos de leishmaniose cutânea e 3.500 casos de leishmaniose visceral todos os anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS, 2014).

A leishmaniose cutânea é a forma mais prevalente da doença no mundo. Dentro das leishmanioses cutâneas o espectro vai desde lesões individuais, restritas a área da picada, até lesões cutâneas disseminadas, as quais se espalham pelo corpo (CARVALHO et al., 1994). Outro tipo de lesão são as que acometem regiões da mucosa do corpo, definidas como mucocutânea. A leishmaniose cutânea pode ser transmitida por várias espécies de *Leishmania*, mas destacam-se, no velho continente, a *L. major*, e, no Novo Mundo, as *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, chegando a matar cerca de 20.000 pessoas por ano no mundo (WHO TECHNICAL REPORT SERIES, 2010). Em humanos essa doença é caracterizada por danos nos órgãos viscerais, incluindo fígado, baço e medula óssea, sendo acompanhada de episódios de febre irregular, anemia e, se não tratada, levando ao óbito na grande maioria dos casos (ALVAR et al., 2012).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos, ou seja, completam o seu ciclo de vida passando por dois hospedeiros. Os vetores adquirem o parasito quando se alimentam dos hospedeiros ou reservatórios que já estão contaminados. Os insetos se contaminam com as formas amastigotas que não possuem flagelo, são arredondadas, isentas de movimento e se localizam no tecido do mamífero ou nas células do sistema polimorfonuclear. Já no intestino do vetor, as formas amastigotas se diferenciam para formas promastigotas que são flageladas, alongadas e móveis. Ainda no aparelho intestinal dos flebotomíneos, em um processo denominado metacicloênese, o parasito assume uma forma infectante, definida como promastigotas metacíclicas, a qual é transmitida para o hospedeiro vertebrado quando fêmeas do inseto realizam o repasto sanguíneo (REINER; LOCKSLEY, 1995). No tecido do hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são fagocitadas ou infectam ativamente, principalmente neutrófilos, monócitos e macrófagos. No interior da célula os parasitos adquirem novamente a forma amastigota, completando o ciclo do parasito. Dentro das células do sistema fagocitário, mais especificamente em

compartimentos denominados fagolisossomas, as amastigotas se dividem e em determinado momento podem se disseminar (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

O modelo de infecção da leishmaniose cutânea, mais especificamente a transmitida pela *L. major*, foi essencial para várias descobertas referentes à doença, mas também proporcionou conhecimentos valiosos para a imunologia. Trata-se de um modelo que retrata bem a dicotomia das repostas Th1/Th2 em C57BL/6 e BALB/c, sendo que, a partir dele, muitas descobertas emergiram na imunologia (MOSMANN et al., 1986). Com esse modelo, foi descrita a importância das células dendríticas e a produção de IL-12 (HEINZEL et al., 1993; VIEIRA et al., 1994), a qual promove a ativação do fator de transcrição nuclear, T-bet, em células T e propicia a manutenção de uma resposta do tipo Th1. A contínua produção de INF- γ e TNF- α por essas células ativa a cascata de sinalização para a transcrição do fator nuclear NF- κ B, induzindo um fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios. Essas células produzem mais TNF- α , IL-1- β e expressam em maior quantidade a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que habilita a produção NO, produto tóxico para o parasito (CHARMOY et al., 2016; SCHLEICHER et al., 2016). Além da essencial produção de NO, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante no controle do parasito (CARNEIRO et al., 2018). Por outro lado, é descrito que, em um ambiente onde células dendríticas produzem predominantemente IL-4, IL-10 e IL-13, a ativação de células T *helper* do tipo 2 (Th2) induz um fenótipo de macrófagos com perfil mais anti-inflamatório, favorecendo a hidrólise da L-arginina pela enzima Arginase 1, gerando produtos como a ureia e a ornitina, fundamental para a síntese de poliaminas (KANE; MOSSER, 2001; ROBERTS et al., 2004). Outro mediador com efeito importante para a indução de células Th2 no modelo de infecção por *L. major* é o TGF- β (BARRAL-NETTO et al., 1992). No caso da leishmaniose, os camundongos C57BL/6 são resistentes ao parasito, enquanto camundongos BALB/c são susceptíveis a *L. major* devido a seus perfis predominantes de reatividade imunológica.

Outros trabalhos reforçaram que o ambiente inflamatório é essencial para resolução da doença. Estudos com camundongos C57BL/6 *knockouts* para Myd88 (MURAILLE et al., 2003), CD40 (BELKAID et al., 2000), entre outros comprovaram que a ativação de receptores do tipo *toll* (TLRs), bem como uma sinalização adequada de células TCD4+, no caso as células Th1, são essenciais para a montagem de uma resposta inflamatória robusta contra o protozoário. Por outro lado, camundongos BALB/c suscetíveis à *L. major knockouts* para a IL-4 (KOPF et al., 1996) desenvolvem

lesões que curam espontaneamente, bem como a adição de IL-12 (AFONSO et al., 1994) e IFN- γ são capazes de reverter quadros de susceptibilidade em diferentes tipos modelos de leishmaniose (BACELLAR et al., 1996; HEINZEL et al., 1993).

O paradigma da resposta Th1 e Th2 foi, por muito tempo, o único recurso utilizado para explicar a variação de prognósticos de leishmaniose cutânea em humanos e camundongos, na qual se observa desde casos de infecção sem desenvolvimento de lesão, até casos onde as lesões são disseminadas por todo corpo dos pacientes com graves consequências (PIRMEZ et al., 1993). Hoje, sabe-se que apesar desse paradigma ser imprescindível para o entendimento da leishmaniose cutânea, ele não explica totalmente a fisiopatologia da doença. Por exemplo, as células NK são importantes para manutenção inicial de IFN- γ e para induzir a produção de IL-12, porém não são essenciais para levar a morte de *L. major* (SCHARTON; SCOTT, 1993). Do mesmo modo, as células T CD8+ são importantes no estabelecimento do ambiente inflamatório e do fenótipo Th1 na infecção com baixas doses de *L. major* (BELKAID et al., 2002). Apesar dessas células poderem agilizar uma cura em animais resistentes, em humanos elas podem mediar um aumento na ulceração de lesões (NOVAIS; SCOTT, 2015). Sabe-se também que até mesmo os componentes da microbiota dos flebotomíneos podem impactar na gravidade da doença (DEY et al., 2018; LOURADOUR et al., 2017). Deste modo, muitos fatores implicam em alterações no curso da infecção e o impacto irá variar de acordo com diferentes modelos e cepas.

Os vetores da leishmaniose possuem um aparelho bucal capaz de rasgar o tecido, produzindo lesões com expressivo dano tecidual e criando um acúmulo de sangue, no qual as fêmeas conseguem se alimentar (BATES, 2007). Nesse tipo de lesão, ficou evidenciado que o recrutamento de neutrófilos minutos após o inóculo tem importante papel no desenvolvimento da resposta imune e na formação de lesão. Além disto, neutrófilos podem fagocitar os parasitos, embora, na maioria das vezes não sejam capazes de eliminá-los, podendo se tornar portas de entrada para a posterior infecção de macrófagos (LAUFS et al., 2002; PETERS et al., 2008). Nas Leishmanioses, os neutrófilos são células fundamentais na definição de resistência ou susceptibilidade. De fato, Peters e colaboradores (2008), mostraram que a depleção de neutrófilos após inoculação intradérmica levou à redução das lesões em tempos precoces no modelo de resistência com baixas doses de *L. major* (PETERS et al., 2008). Por outro lado, em modelos de infecção de camundongos susceptíveis à *L.*

major e *L. amazonenses*, neutrófilos tiveram função protetora em estágios iniciais da doença (SOUSA et al., 2014; TACCHINI-COTTIER et al., 2000). Além disso, os produtos da degranulação de neutrófilos, como a elastase e defensinas, possuem papéis relevantes no curso da infecção. No caso, a elastase é capaz de induzir a atividade microbicida de macrófagos através de TLR4, enquanto as defensinas induzem um programa de morte celular em *L. donovani* (BERA et al., 2003; RIBEIRO-GOMES et al., 2007).

Recentemente, foi descrito que monócitos inflamatórios são subtipos celulares que chegam na lesão posteriormente aos neutrófilos e são também eficientes para fagocitose, sendo muito importantes no prognóstico da doença (ROMANO et al., 2017). Além deles, os macrófagos recém derivados de monócitos e macrófagos residentes são os principais agentes ativos no combate à Leishmania. Tais células podem ser ativamente infectadas pelos parasitos ou realizar fagocitose através de receptores específicos para o protozoário, ou ainda quando estes estão opsonizados. Dentre esses receptores, o receptor de manose (CD206), o qual é um marcador de macrófagos com assinatura anti-inflamatória, foi apontado como um definidor de populações dermais, as quais são eficazes em fagocitar o parasito, porém não possuem efeito leishmanicida (LEE et al., 2018a). Por outro lado, monócitos têm sido caracterizados como uma população de células essenciais para o controle do parasito em vários modelos. Por exemplo, foi demonstrado que camundongos C57BL/6 deficientes para CCR2, receptor da quimiocina atraente de monócitos CCL2, apresentavam lesões incuráveis (SATO et al., 2000). Apesar de alguns fatores serem essenciais para a eliminação do parasito, de fato, a estabilização de um ambiente inflamatório é crucial para resolução da infecção.

Em camundongos e em humanos, a cura da leishmaniose cutânea por *L. major* nunca é estéril. Os parasitos remanescentes são mantidos no sítio da infecção ao longo da vida do hospedeiro por células Tregs e pela produção simultânea de IL-10 e IFN- γ por essas células (BELKAID et al., 2002). A presença permanente de parasitos é essencial para a indução de uma rápida resposta do hospedeiro frente a casos de reinfecção. Monócitos inflamatórios (CCR2⁺CX3CR1⁺LY6C⁺) foram apontados como células que expressam iNOS em sítios de reinfecção (ROMANO et al., 2017). Alguns subtipos de células T também são fundamentais para essa rápida resposta; dentre elas, células CD4⁺LY6C⁺Tbet^{hi}, as quais são de curta duração e são capazes de migrar

rapidamente para um local de uma nova infecção (PETERS et al., 2014). Nesse cenário, células T de memória também auxiliam na composição da imunidade.

Deste modo, o modelo de infecção por *Leishmania sp.* se mostra extremamente interessante para diversos estudos, ainda mais porque não existem vacinas eficazes para as leishmanioses que acometem os humanos.

3 HIPÓTESE DE TRABALHO

A hipótese do presente trabalho é que a obesidade induzida por dieta HSB seria capaz de alterar o perfil da resposta celular à infecção por *L. major* principalmente pelo seu impacto nas populações de células da imunidade inata (neutrófilos, monócitos e macrófagos) nas fases iniciais e crônicas da infecção (Figura 1).

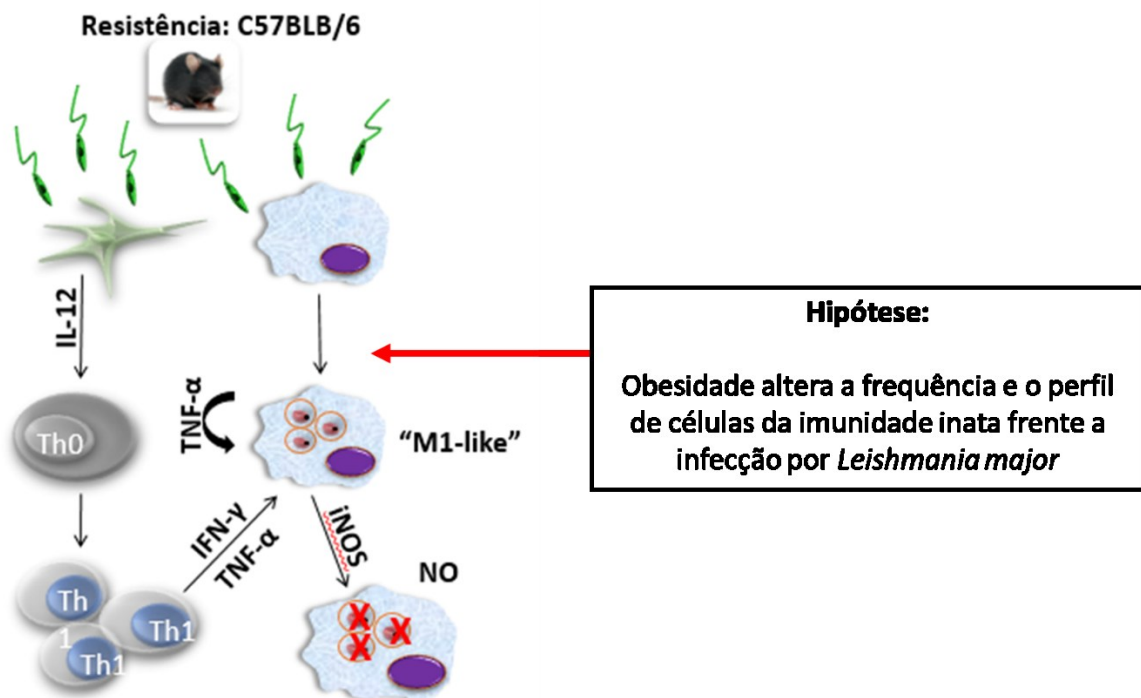


Figura 1: Modelo do desenvolvimento da resposta Th1 e hipótese de trabalho.

As células dendríticas de camundongos C57BL/6 infectados por *L. major* produzem IL-12 induzindo a diferenciação de células T *naive* para células Th1. Essas células produzem IFN- γ e TNF- α , induzindo a expressão de iNOS em macrófagos e a produção de NO que é essencial para a eliminação do parasito. As alterações produzidas sistemicamente pela obesidade seriam capazes de interferir na atividade dessas células dendríticas e desses macrófagos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar se a obesidade induzida por dieta hipercalórica altera as populações celulares da imunidade inata frente à infecção por *L. major* para tentar explicar como essa condição pode diminuir a resistência ao parasito.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir obesidade e alterações metabólicas associadas nos camundongos C57BL/6 e posteriormente infectar esses animais.
- ✓ Analisar o desenvolvimento da lesão e avaliar a carga parasitária nos camundongos infectados na orelha com *L. major* e alimentados com a dieta hipercalórica ou dieta padrão.
- ✓ Verificar se há diferença no perfil de linfócitos presentes nos linfonodos drenantes dos camundongos obesos infectados.
- ✓ Avaliar o perfil de neutrófilos, monócitos inflamatórios, monócitos de patrulha e macrófagos na orelha, baço, tecido adiposo e sangue dos animais infectados.
- ✓ Avaliar se as células da imunidade inata presente na lesão e no baço dos camundongos obesos possuem perfil compatível com resistência ou susceptibilidade à infecção.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 fornecidos pelo biotério central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia da UFMG, em gaiolas de plástico, contendo no máximo 5 animais/gaiola. Os animais receberam água e dieta controle (AIN93G) ou dieta indutora de obesidade (HSB) (Tabela1) a vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo de submissão número 338/ 2012 (Anexo 1).

5.2 Dieta indutora de obesidade

Os animais foram alimentados *ad libitum* com a dieta controle (AIN 93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) ou com a dieta hipercalórica contendo teores mais altos de lipídeos (manteiga) e carboidratos (açúcar refinado) (high sugar butter, HSB) (MAIOLI et al., 2016). A composição de ambas as dietas se encontra nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Ingredientes das dietas controle e hipercalórica

	Controle (AIN 93G)	HSB (hipercalórica)
Amido de milho (g)	397,5	208,6
Caseína (g)	200	200
Amido dextrinizado (g)	132	0
Açúcar (g)	100	232
Óleo de soja (g)	70	70
Celulose (g)	50	50
Mix mineral (g)	35	35
Mix de vitaminas (g)	10	10
Cistina (metionina) (g)	3	3
Bitartarato de colina (g)	2,5	2,5
BHT (g)	0,014	0,014
Manteiga (g)	0	188,9
TOTAL (g)	1000	1000

g: gramas; AIN 93 G: Dieta padrão para roedores; HSF: dieta indutora de obesidade; BHT: hidroxitolueno butilado.

Tabela 2 – Composição nutricional (macronutrientes) das dietas controle e hipercalórica

	Controle (AIN 93G)	HSF (Hiper-calórica)
Carboidrato (kcal)	1990	2518
Proteína (kcal)	812	812
Lipídio (kcal)	630	630
Calorias (por gramas)	3,43	3,96
Carboidrato (%/peso)	63	44,1
Proteína (%/peso)	20	20
Lipídeo (%/peso)	7	27

Kcal: quilocalorias; AIN: dieta padrão para roedores; HSF: dieta indutora de obesidade.

5.3 Parasito

Os parasitos utilizados foram da espécie *Leishmania (Leishmania) major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) cultivados em meio de Grace (GIBCOBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) pH 6.2 suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 20µg/mL de sulfato de gentamicina (Schering-Plough – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2mM de L-glutamina (GIBCOBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA), mantidos em estufa a 25°C. Os repiques foram feitos a cada dois ou três dias de cultivo. Em condições estéreis, os inóculos foram preparados com culturas de cinco dias, fase estacionária do crescimento *in vitro*, época em que a cultura está rica em formas promastigotas metacíclicas. O meio de cultura com *Leishmania* em fase estacionária foi centrifugado a 1500 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o *pellet* foi recuperado em 2mL de salina tamponada com 0,01 M de fosfato de sódio pH 7,2 (PBS). Em seguida as formas promastigotas metacíclicas foram separadas por gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma- Aldrich, INC., St Louis, MO, EUA). Em um tubo cônico de 15mL, foram colocados 2mL de Ficoll 20%, em seguida 2mL de Ficoll 10%, escorrendo pela parede do tubo, sem homogeneizar as duas soluções, formando duas fases distintas (gradiente de Ficoll). Finalmente, a suspensão de *Leishmania*, foi acrescentada escoando com cuidado pela parede do tubo formando a terceira fase. Essa mistura trifásica foi centrifugada a 800 x g por 10

min a 4° C. Formou-se um anel branco e todo o sobrenadante acima dele, correspondendo às fases Ficoll 10% e *Leishmania* em PBS, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em outro tubo, adicionou-se 10 mL de PBS ao sobrenadante coletado e essa suspensão foi centrifugada a 1500 x g por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante formado foi desprezado e o sedimento foi recuperado em 2mL de PBS. Foi retirada uma alíquota diluída 1:100 em PBS contendo formalina a 4% e o número de parasitos foi contado em câmara de Neubauer.

5.4 Desenho experimental

Camundongos machos C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas foram separados em quatro grupos: animais controles, alimentados com dieta AIN93G (AIN); animais obesos, alimentados com dieta indutora de obesidade (HSB); animais controles e infectados (AIN-INF); e animais obesos infectados (HSB-INF). A dieta foi ofertada por 20 semanas no total. Na 12ª semana de consumo de dieta, quando obesidade está bem estabelecida e a maioria dos efeitos metabólicos decorrentes dessa condição já estão bem definidos (MAIOLI et al., 2016b), os animais foram infectados com uma dose de 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *Leishmania major* e acompanhados até a oitava semana de infecção. O tempo de infecção e a dose foram definidas com base em estudo do grupo de Nathan Peters, no qual a cinética da infecção nas fases agudas é bem definida (ROMANO et al., 2017). Semanalmente, os animais tiveram o peso corporal e glicemia acompanhados. Os animais foram eutanasiados 2 dias e 8 semanas após a infecção. A 8ª semana seria o momento onde a lesão se apresenta crônica e há perceptível melhora do grupo controle em relação ao grupo obeso. Em ambos os tempos, células da orelha, baço, tecido adiposo e sangue foram analisados.

Para infecção, foram utilizados 2×10^5 promastigotas metacíclicas obtidas após 5 dias de cultivo, na fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram inoculados por via subcutânea na orelha esquerda de cada animal (10µL). Os animais do grupo controle que foram avaliados 2 dias após a infecção, receberam a o mesmo volume (10µL) de PBS na orelha esquerda. Com auxílio de um paquímetro (Starret), avaliou-se o curso de infecção semanalmente por meio do cálculo da diferença entre o diâmetro e a espessura da orelha infectada e da orelha não infectada.

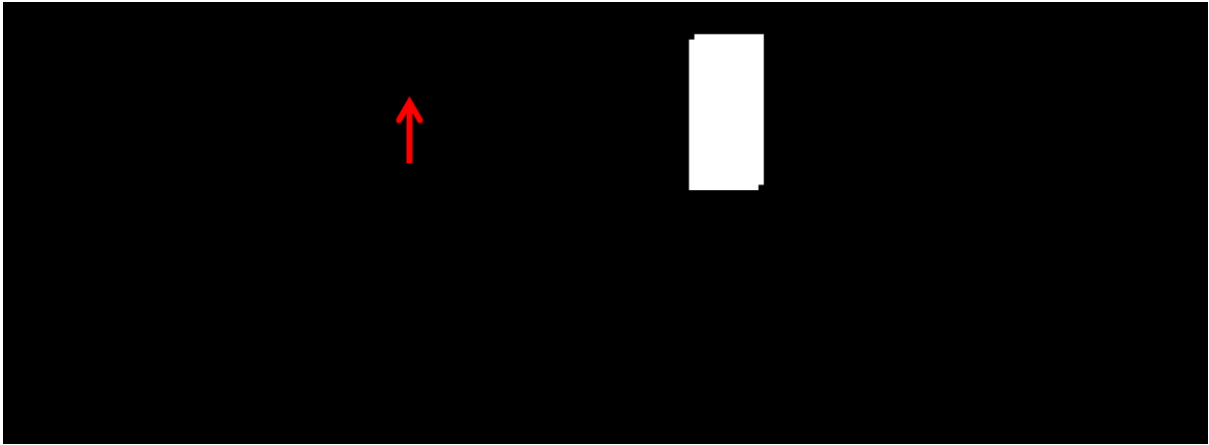


Figura 2: Desenho experimental. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com uma dose de 2×10^5 com *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados e foram coletados sangue, baço, tecido, tecido adiposo e orelha para análise por citometria de fluxo

5.5 Quantificações de parasitos na orelha

Após a eutanásia, coletou-se a orelha infectada. A orelha foi picotada em tubo estéril. Em seguida tecido foi macerado com adição de PBS. Esse ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente (VIEIRA et al., 1996). Em tubos cônicos de 15 mL foi completado o volume para 4 mL com PBS estéril e logo em seguida o material foi centrifugado a $150 \times g$ por 2 min à 4°C para retirada de fragmentos de tecido remanescentes. O sobrenadante foi novamente centrifugado a $1540 \times g$ por 10 min a 4°C. As células sedimentadas foram ressuspensas em 450 μ L de meio Grace acrescido de 20% de soro fetal bovino, L-glutamina a 2 mM e 20 μ g/mL de sulfato de gentamicina. O material foi distribuído, em duplicatas, em placa estéril de 96 poços. Fez-se diluição seriada de 1:10 por 12 poços subsequentes. A placa foi incubada em estufa à 25°C por 10 dias, quando foi feita a leitura do crescimento de parasitas, em microscópio invertido (Zeiss). O resultado obtido foi expresso como o logaritmo do inverso da maior diluição que apresentou crescimento positivo de parasitos.

5.6 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi implementada para análise fenotípica de vários tipos celulares, bem como expressão de determinadas moléculas em diferentes tipos de órgãos. Sendo assim, a descrição das técnicas de extração de células para cada órgão, bem como a estratégia de isolamento de populações delimitadas utilizadas em cada experimento serão abordadas separadamente a seguir.

5.6.1 Extração e análise de células extraídas da orelha

O procedimento de extração das células da orelha teve, como referência, o trabalho de Peters e colaboradores (PETERS et al., 2014). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg) (definidos pelo CEUA UFMG), e eutanasiados por deslocamento cervical. As orelhas foram retiradas, os pelos excedentes foram raspados, e as orelhas ficaram por 3 minutos imersas em etanol 70%. As orelhas foram divididas em duas porções (ventral e dorsal) e postas em poços individuais, em placa de 24 poços. A primeira incubação foi realizada com 500µL de solução com 62,5 µg/mL de Liberase TL – complexo de enzimas digestivas (Roche) em meio de cultura RPMI (Gibco), para dissociação do tecido rico em colágeno. As orelhas ficaram incubadas em estufa de CO₂ por 1 hora e 30 minutos à 37°C. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida com solução de RPMI acrescido de 5% de Soro Fetal Bovino e 0,05% de desoxiribonuclease I (Sigma). O tecido e o líquido foram transferidos para uma placa de 6 poços e as orelhas foram maceradas sobre o filtro de células de 50 µm (Sigma); o homogenato foi mantido em gelo. Após maceradas, as células foram coletadas em tubos cônicos de 15 mL, e centrifugadas por dez minutos à 1200g em centrífuga refrigerada à 4°C. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

A estratégia de separação por populações aplicada para análise de neutrófilos e subtipos de monócitos nas orelhas de camundongos infectados ou não infectados, tomou como base os estudos de Chamoy e Romano, os quais estabeleceram quais células participam ativamente na fagocitose do parasito nos tempos iniciais da infecção (Figura 3) (CHARMOY et al., 2016; ROMANO et al., 2017).

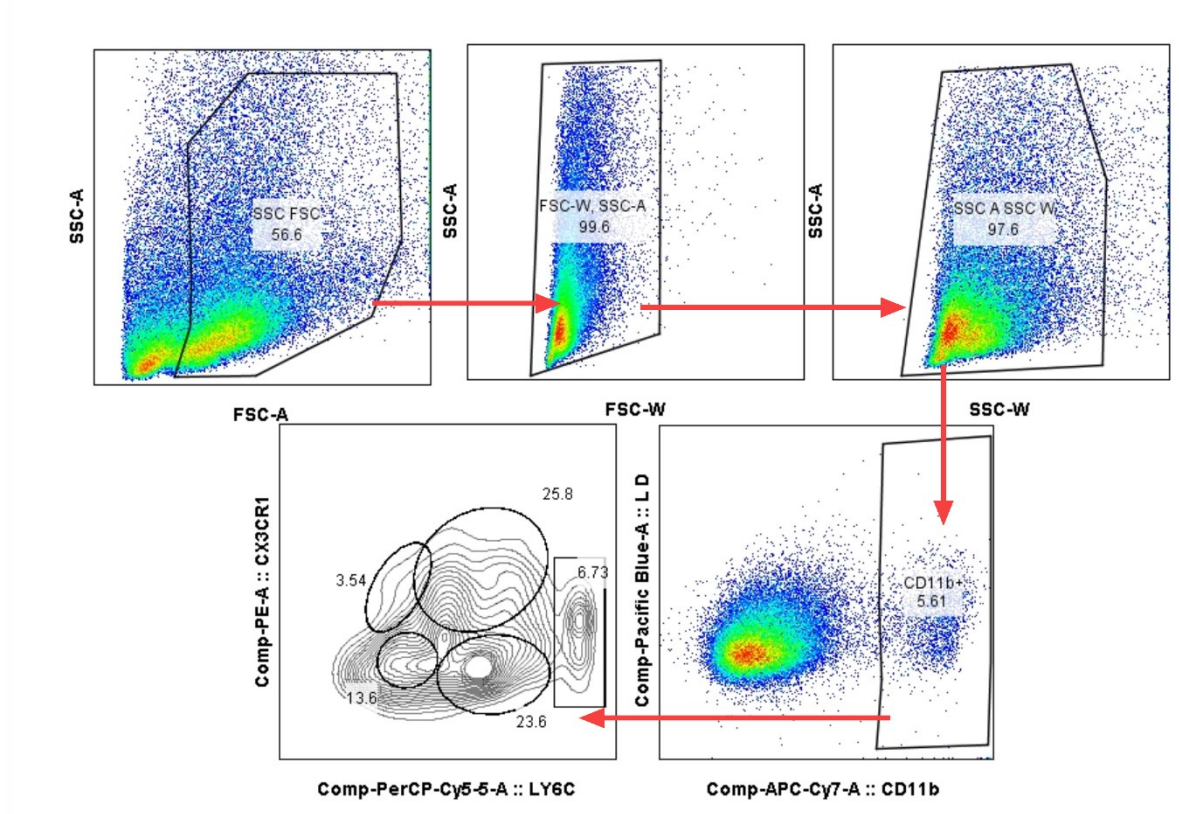


Figura 3: Estratégia de *gating* para análise de células extraídas da orelha. As células foram selecionadas com base na dispersão frontal e lateral (Forward Scatter x Side Scatter), os *doublets* foram excluídos empregando o isolamento de células por FSC-W e SSC-W. As células mortas foram também excluídas pelo *gating* nas células utilizando o corante TM Fixable Aqua Stain Kit, L34957 LIVE/DEAD que marca positivamente as células mortas. As células mieloides foram selecionadas como CD11b⁺. A partir dessa população mielóide, definiu-se as populações de células residentes (Ly6C⁻CX3Cr1⁻), monócitos inflamatórios (Ly6C^{int/high}CX3Cr1⁻), monócitos de patrulha (Ly6C⁻CX3Cr1⁺) e neutrófilos (Ly6C^{int}CX3Cr1⁻) empregando o isolamento de células para as populações positivas de Ly6C e CX3CR1

5.6.2 Extração e análise de células extraídas do tecido adiposo

O procedimento de extração de células do tecido adiposo sucedeu com adaptações como descrito anteriormente (CHO; MORRIS; LUMENG, 2014). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg) (preconizado pelo CEUA da UFMG), e eutanasiados por deslocamento cervical. Todo o protocolo foi executado, tendo o cuidado para que o tecido e as células fiquem constantemente sobre o gelo. Primeiramente, foi feita a

desinfecção da pele com etanol 70%. O tecido adiposo perigonadal foi exposto com técnica estéril, e as gônadas removidas. Aproximadamente 500mg do tecido foi pesado e posteriormente lavado com PBS para remoção de contaminantes. Em tubos de 1,5mL, o tecido adiposo foi picotado em pedaços pequenos com tesoura (aprox. 3-5 mm de tamanho). Após picotados, deve-se adicionar 2ml da solução de colagenase: RPMI, 2mg/mL de Colagenase tipo II (Sigma) e 150µg/mL desoxiribonuclease I (Sigma). O tecido picotado foi colocado sob algum recipiente fechado, e submetido a vigorosa agitação à 37°C por uma hora. Após o período de agitação, o tecido ficou no gelo por 5 min para interromper a reação de digestão da colagenase. Com auxílio de uma seringa, o homogenato foi sugado e expelido por uma agulha (22G), com intuito de remover os adipócitos (procedimento deve ser repetido por 4 vezes). O homogenato então foi filtrado em filtro de células de 100 µm e colocados em tubos cônicos de 50mL. Todo material remanescente no filtro, foi lavado com meio RPMI contendo 5% de SFB, até completar 10mL no tubo. Os tubos com as soluções foram centrifugados a 500×g por 10 minutos à 4°C. A camada de gordura fica no sobrenadante, enquanto os leucócitos no infranadante e no *pellet*. O sobrenadante foi aspirado gentilmente e descartado. Por fim, o *pellet* foi desfeito junto ao infranadante, o homogenato transferido para tubos cônicos de 15 mL e o volume total acertado com RPMI acrescido de 5% de SFB para 2mL. Os tubos foram centrifugados por dez minutos à 1200×g em centrifuga refrigerada à 4°C. As células que ficaram sedimentadas, foram ressuspensas em meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%. As análises de células extraídas do tecido adiposo seguiram como descrito previamente (Figura 4) (CHO; MORRIS; LUMENG, 2014).

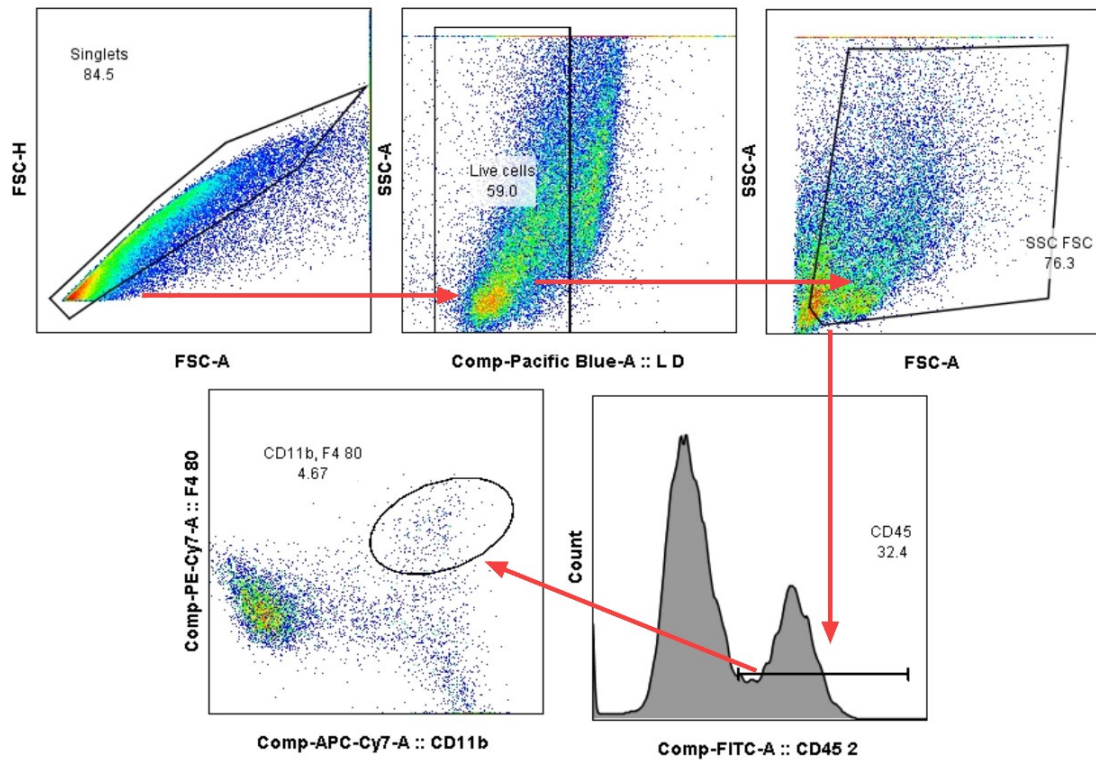


Figura 4: Estratégia de separação de populações utilizada para análise de macrófagos de tecido adiposo. Primeiramente, os *singlets*, foram determinados com base no gating FSC-A x FSC-W). Agregados celulares e células mortas (L/D+) foram excluídos pela primeira vez. Em seguida, os leucócitos do tecido adiposo foram selecionados com base no tamanho celular e granulosidade (SSC-A x FSC-A) e pela expressão de CD45. Os macrófagos do tecido adiposo (ATM) de camundongos magros e obesos co-expressam F4/80 e CD11b. Sendo assim, células positivas para F4/80 e CD11b foram selecionadas a partir de células CD45+.

5.6.3 Extração e análise de células extraídas do sangue

Os animais de cada grupo foram eutanasiados por superdosagem anestésica; utilizando 180 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilasina, administrada via intraperitoneal. O animal foi aberto pela cavidade torácica para expor o coração. O sangue foi retirado por pulsão cardíaca. O sangue foi coletado, utilizando EDTA como anticoagulante, em tubos de polietileno que já continham os anticorpos previamente diluídos (segundo as titulações presente na Tabela 1) e incubados no dia

anterior. Os tubos foram homogeneizados e incubados novamente, ao abrigo da luz, por 30 minutos à 4°C. Antes de usar o sangue para análise de citometria de fluxo, os glóbulos vermelhos (RBC) foram lisados. Para lise de hemácias, utilizou-se solução de lise de hemácias (RBC lysis Buffer - eBioscience). Para cada 100µL de sangue, adicionou-se 2mL da solução de lise. Os tubos foram incubados novamente por 10 minutos ao abrigo da luz à 4°C. Após a lise, foram adicionados 1mL de PBS em cada tubo, completando o volume para 3mL. Os tubos foram centrifugados a 500xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado e homogeneizado em 200µL de meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

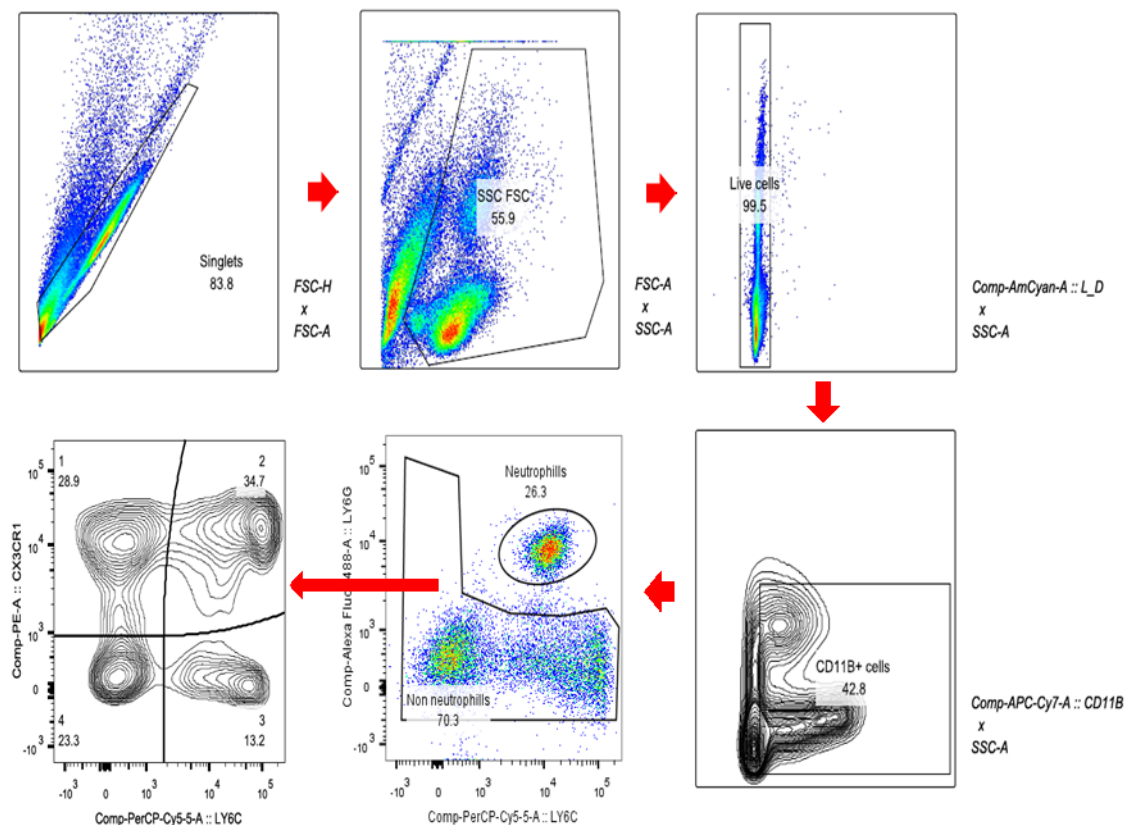


Figura 5: Estratégia de separação das populações utilizada para identificar e caracterizar neutrófilos e monócitos do sangue. Células vivas foram selecionadas de acordo com o marcador de morte celular (LD). As células mieloides foram selecionados com base no tamanho e granulosidade celular (SSC-A x FSC-A) e pela expressão de CD11b+. Na população de células mieloides, foram selecionadas as populações de neutrófilos e monócitos com base na expressão de Ly6G, LY6C e CX3CR1.

5.6.4 Extração e análise de células do baço

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg), e eutanasiados por deslocamento cervical. O baço foi retirado, então, o órgão foi macerado, e as suspensões celulares foram homogeneizadas e centrifugadas à 500g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A lise de hemácias do baço foi feita com água e posteriormente a osmolaridade foi ajustada com PBS concentrado a 10 vezes. Assim, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em RPMI acrescido de 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50µM de β-mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2. As células foram contadas no microscópio óptico, com câmara de Neubauer.

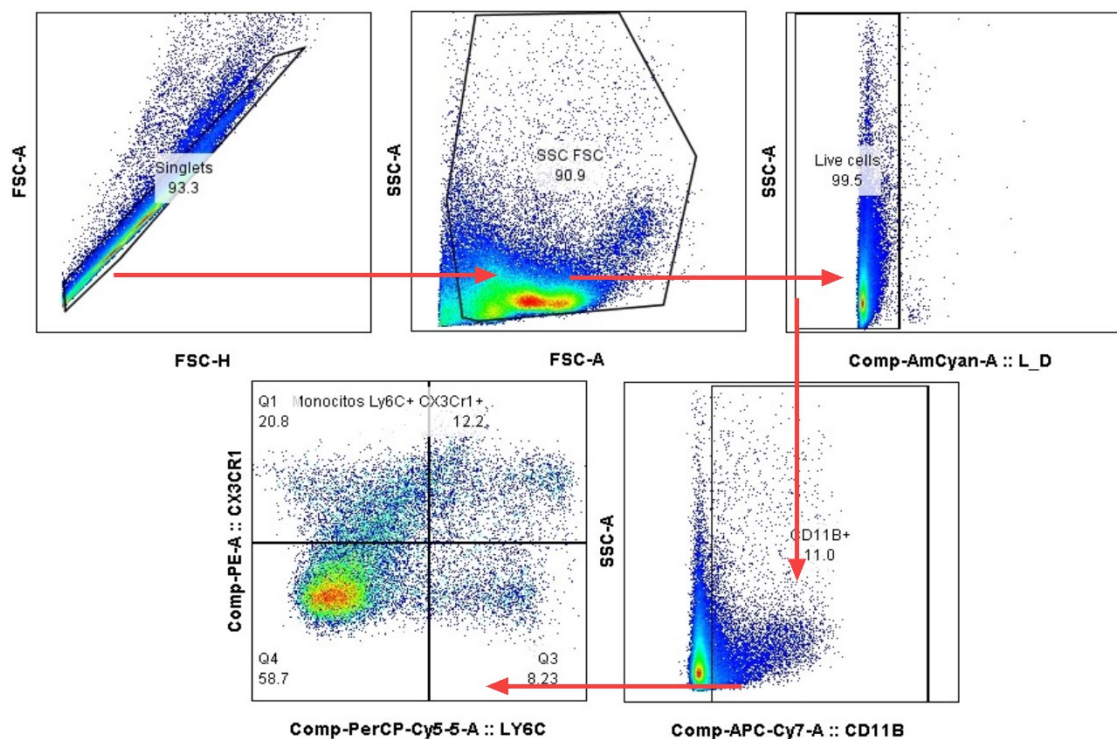


Figura 6: Estratégia de separação de células utilizada para identificar e caracterizar células extraídas do baço. Foram selecionados os *singlets* (FSC-A x FSC-H). Células vivas foram selecionadas pela marcação com o marcador Live/Dead (LD). Os leucócitos foram selecionados com base no tamanho e granulosidade celular (SSC-A x FSC-A). As células mieloides foram selecionados pela expressão de CD11b. As populações de neutrófilos e monócitos com base na expressão de Ly6G, LY6C e CX3CR11.

5.6.5 Marcação de células para citometria de fluxo

Após centrifugação e ressuspensão em meio RPMI, as células dos respectivos órgãos foram lavadas com PBS acrescido de 0,5% de albumina bovina (BSA) (PBS-wash) e então incubadas com Fc-block (anti-CD16/32 - BD Biosciences) em gelo por 30 minutos. Após lavagem e centrifugação, as células receberam 10µl de variadas combinações de anticorpos de superfície (diluídos previamente de acordo com as titulações presentes na Tabela 3. Os fluorocromos associados com anticorpos utilizados para análise das células da orelha, baço, sangue, tecido adiposo e linfonodos foram: Ficoeritrina (PE) conjugado com CX3CR1 e TLR, PECy7 conjugado com F4/80, isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com Ly6G, FOXP3 ou com CD45, peridina clorofila (Per-CP)cy5.5 conjugado com Ly6C e LAP Aloficocianina (APC) conjugado com CD206, APCcy7 conjugado com CD11b, Pacific blue conjugado com Live/Dead (L/D), Amycyan conjugado com L/D. 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 e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspendido em 200 µl de solução fixadora contendo 1% paraformaldeído. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de leitura apropriados (7,5 cm x 1cm), armazenadas a 4°C e protegidas de luz. Os dados foram coletados utilizando-se o citômetro FACSCanto II acoplado ao software Diva (BD Biosciences) e analisados utilizando-se o software FlowJo (TreeStar). Os *gatings* foram determinados empregando controles de isotipos e / ou comparação com as populações controle e as amostras *fluorescence minus one* (FMO). Para os controles e FMOs, adquiriu-se cerca de 20.000 eventos. Já para as amostras, foram adquiridos 20.000 a 50.000 eventos.

Tabela 3 – Titulações dos anticorpos utilizados para marcação de citometria de fluxo

Molécula	Anticorpo	Diluição	Marca
F4/80	Pe-Cy7 (Ficoeritrina <i>Cy-chrome 7</i>)	1:400	Biolegend
Ly6C	Percp-Cy 5.5	1:400	BD
LY6G	FITC	1:400	BD
CD4	PE	1:500	BD Pharminogen
CD11b	APCCy7	1:400	Biolegend
LIVE/DEAD	Pacific Blue	1:500	eBioscience
CD206	APC (Aloficocianina)	1:200	Biolegend
CX ₃ CR1	PE (Ficoeritrina)	1:300	Biolegend
<i>Fc Block</i>	-	1:100	BD Pharminogen
FOXP3	FITC	1:200	BD
TLR4	PE	1:200	Biolegend
LAP	Percp-Cy 5.5	1:100	BD Pharminogen
CD45	FITC	1:400	eBioscience

*Foram utilizadas células não marcadas, marcações controles e FMOs para as análises.

6 RESULTADOS

6.1 A obesidade aumentou a suscetibilidade à infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6

Para confirmar resultado anterior do nosso grupo mostrando que a dieta HSB realmente induzia obesidade, o peso dos animais foi avaliado semanalmente durante o experimento. Os camundongos que consumiram a dieta hipercalórica, apresentaram ganho significativo de peso a partir da 6^a semana de consumo, e essa diferença no peso se estendeu até o fim do tratamento (Figura 1A). Parâmetros metabólicos não foram avaliados, já que em trabalho prévio do nosso grupo estes parâmetros foram determinados nos camundongos com obesidade induzida por dieta HSB e infectados por *L. major*, de modo que os animais obesos apresentaram resistência à insulina, com elevada glicemia e altos níveis de LDL a partir da 8^a semana de dieta (MAIOLI et al., 2018). Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha esquerda com 2×10^5 promastigotas de *L. major*, e as lesões nas orelhas dos animais foram acompanhadas semanalmente (Figura 7A). Apenas a partir da 3^a semana após a infecção foi possível visualizar macroscopicamente essas lesões. Entre a 4^a e a 6^a semana de infecção, as lesões nos animais de ambos os grupos foram similares, porém, a partir da sétima semana, os animais do grupo AIN apresentaram considerável melhora, enquanto os animais do grupo de animais obesos apresentaram lesões mais ulceradas, com maior edema e com diâmetros crescentes (Figura 7B). Em relação a carga parasitária, com 2 dias infecção, os animais de ambos os grupos apresentaram um crescimento mínimo de parasitos. Já com 8 semanas de infecção, os animais obesos apresentaram uma maior carga de parasitos nas orelhas infectadas quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7C). De fato, o maior tamanho das lesões nos animais obesos na 8^a semana de infecção (Figura 7D) se correlacionou com maior carga de parasitos nas orelhas.

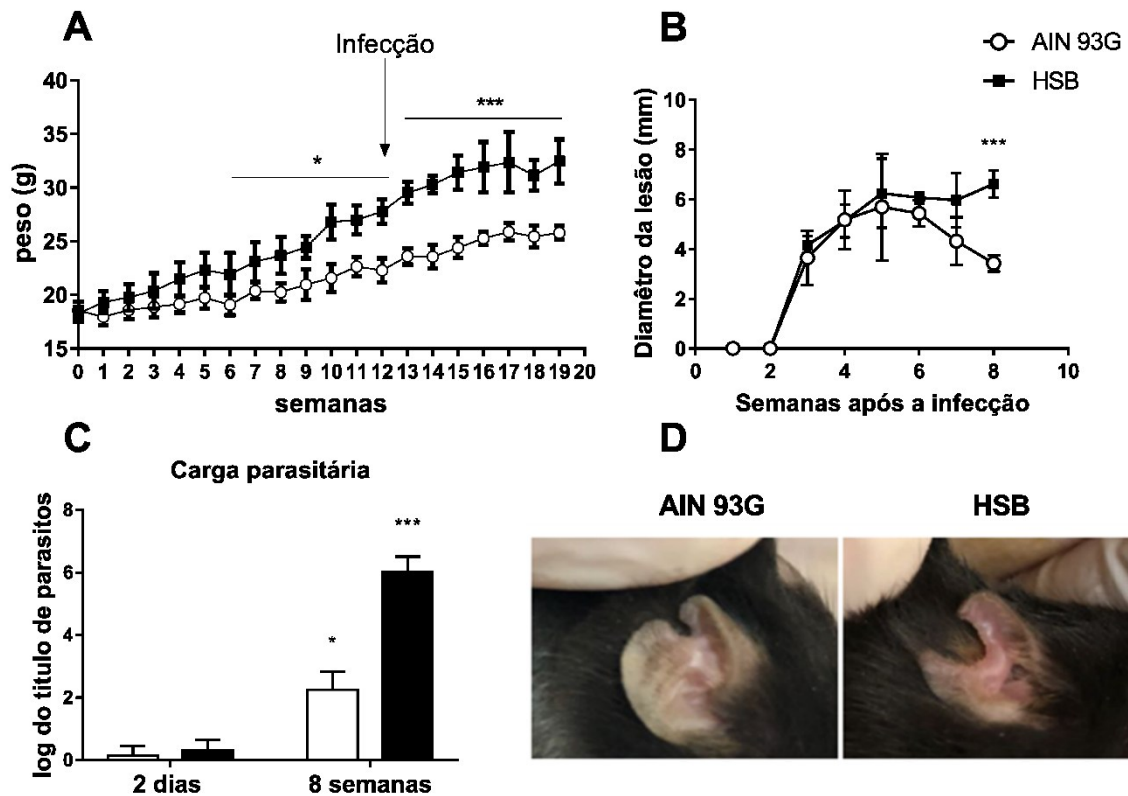


Figura 7 - Avaliação da lesão e da carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das lesões e da carga parasitária. (A) Média dos pesos dos camundongos alimentados com as dietas AIN93G e HSB; (B) diâmetro das lesões nas orelhas de camundongos durante 8 semanas de infecção; (C) carga de parasitos nas orelhas de camundongos, 2 dias e 8 semanas após a infecção; (D) imagens representativas das lesões, no final de 8 semanas de infecção. A análise estatística foi feita pelo teste *t student* comparando AIN versus HSB nos diferentes tempos de infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos similares.

6.2 A frequência de células Treg CD4+ Foxp3+ não se alterou em camundongos obesos infectados com *L. major*

As células Tregs exercem um papel importante na manutenção da homeostasia do corpo, bem como controle da imunidade relacionada à infecção por *L. major* (BELKAID et al., 2002). Como os camundongos C57BL/6 obesos apresentaram suscetibilidade aumentada à infecção por *L. major*, nossa primeira hipótese foi que a obesidade alteraria as frequências de células T reguladoras comprometendo, assim, a resposta imune à infecção. Primeiramente, investigamos as frequências dessas células no baço e nos linfonodos auriculares que drenavam a lesão dos animais infectados ou desafiados com PBS nos tempos de 2 dias e 8 semanas após a infecção. Verificamos diferença apenas nos linfonodos drenantes de camundongos não infectados sendo que os animais obesos apresentaram uma frequência de células Treg maior que os animais alimentados com dieta controle (Figura 8A). Nesse órgão, a infecção por si só não foi capaz de gerar alterações na frequência de Tregs entre os grupos. Já no baço, houve um aumento na frequência de células Tregs nos grupos AIN e HSB infectados por 8 semanas, porém estes não se diferem entre si (Figura 8B). De maneira geral, os dados mostram que, embora haja um aumento de células Treg relacionado com a obesidade, estas células não parecem relacionadas ao aumento na susceptibilidade à infecção observada em camundongos obesos.

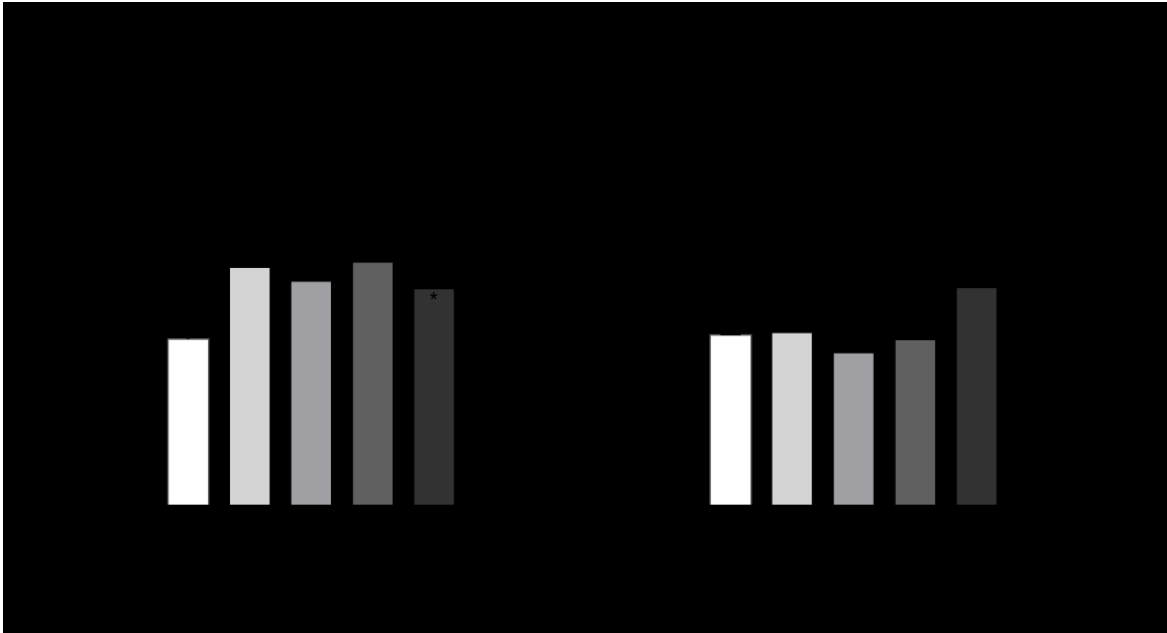


Figura 8 – Frequência de células CD4+ FOXP3+ no baço e nos linfonodos drenantes da lesão de camundongos C57BL/6 obesos e controles infectados ou não com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12ª semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células Treg. (A) Frequência de células Tregs (CD4⁺FOXP3⁺) nos linfonodos drenantes; (B) frequência de células Tregs (CD4⁺FOXP3⁺) no baço. A análise estatística foi feita pelo teste *t student* comparando AIN versus HSB nos diferentes tempos de infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos similares

6.3 A obesidade resultou em diminuição na frequência de neutrófilos na orelha de camundongos infectados 2 dias após a infecção

É demonstrado que a resposta inicial frente a infecção por *L. major* é fundamental para definir o curso da infecção em C57BL/6. Especificamente, o recrutamento de neutrófilos desde os primeiros minutos após a infecção e a posterior chegada de monócitos possuem importante papel na resistência ou suscetibilidade à infecção (PETERS et al., 2008; ROMANO et al., 2017).

Deste modo, decidimos avaliar o percentual de neutrófilos e de subtipos de monócitos nas orelhas (Figura 9A) dos camundongos infectados, 48 horas após a

infecção por *L. major*. A contagem de células mieloides CD11b⁺ nas orelhas infectadas com *L. major* ou injetadas com PBS, demonstrou um recrutamento similar de células para o local da lesão nos animais de todos os grupos, independentemente da presença do parasito. De maneira interessante, os animais do grupo AIN-INF, apresentaram maior frequência de neutrófilos quando comparados aos animais HSB-INF no sítio da infecção (Figura 9C). Esse resultado é intrigante, pois a persistência de neutrófilos na lesão está associada com maior suscetibilidade à infecção (PETERS et al., 2008). Os monócitos inflamatórios que são recrutados em maior proporção a partir do segundo dia de infecção, têm papel crucial no controle do crescimento dos parasitos. No entanto, não verificamos diferença estatística entre as populações de monócitos inflamatórios. Foi verificada uma pequena diferença na frequência de células residentes entre os animais do grupo AIN-INF e do grupo AIN, de modo que o grupo sem infecção apresentou maior frequência dessas células (Figura 9E). Não observamos diferenças nas populações de monócitos de patrulha (Figura 9F) ou de monócitos Ly6C^{hi} (Figura 9G) entre os grupos.

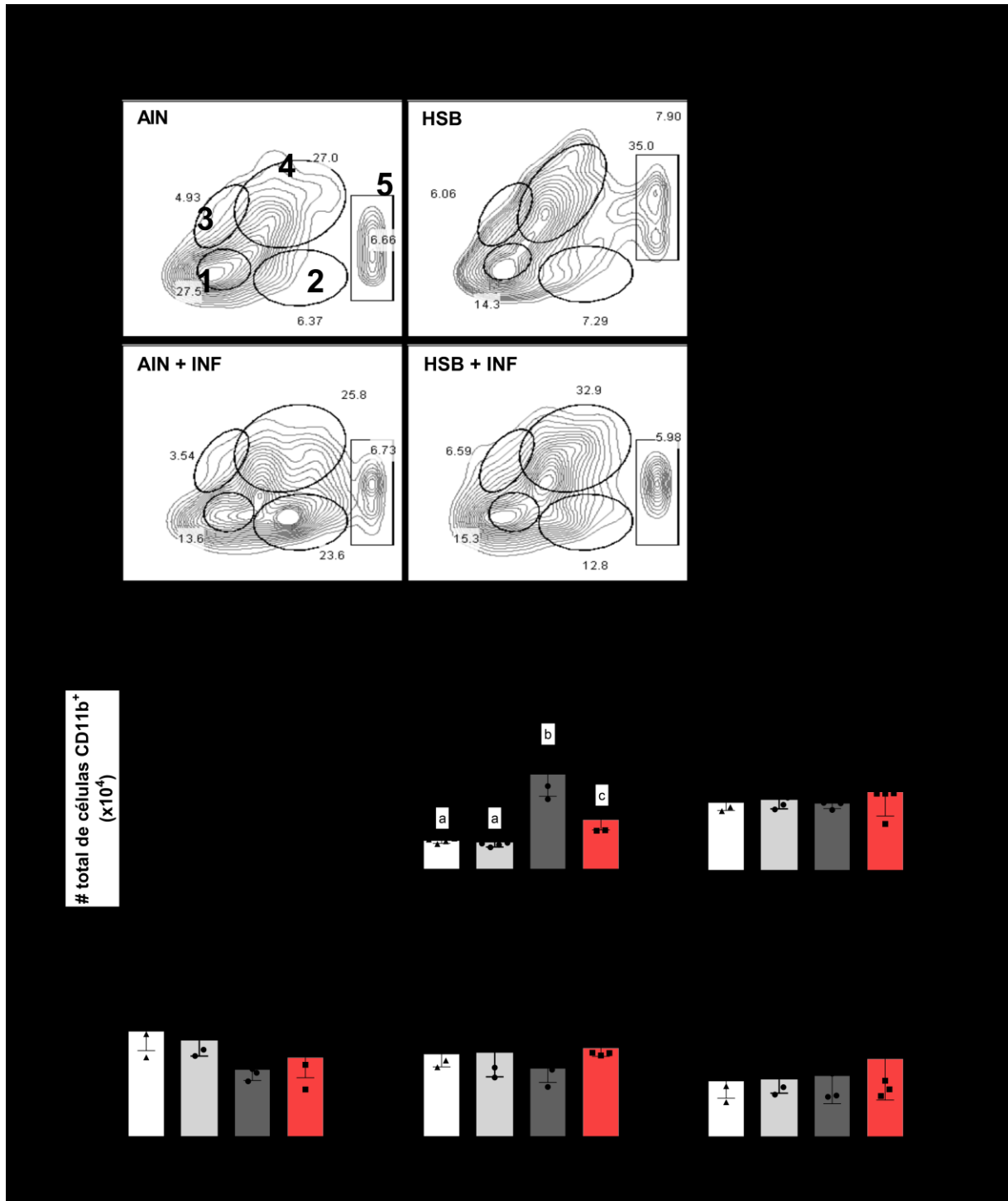


Figura 9. Avaliação da frequência de neutrófilos, subtipos de monócitos e células residentes nas orelhas 2 dias após a infecção com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides presentes nas orelhas dos animais. (A) Gráficos representativos das populações das células analisadas na orelha; (B) número de células CD11b⁺; (C) frequência de neutrófilos

(Ly6C^{int}CX₃CR1⁺); (D) frequência de monócitos (Ly6C⁺CX₃CR1⁺); (E) frequência de células residentes (Ly6C⁻CX₃CR1⁻); (F) frequência de monócitos de patrulha (Ly6C⁺CX₃CR1⁺) e (G) frequência de monócitos Ly6C^{hi}. A análise estatística foi feita pelo teste *one-way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares.

6.4 A obesidade induziu aumento na frequência de neutrófilos circulantes dois dias após a infecção.

A fim de verificar os possíveis efeitos sistêmicos da obesidade e uma possível implicação na resposta imune ao parasito, analisamos as frequências de neutrófilos no sangue após a infecção por *L. major* (Figura 10A).

No tempo de 2 dias após a infecção, os camundongos obesos apresentaram maior frequência de neutrófilos circulantes em comparação com animais alimentados com a dieta controle (Figura 10B). Vale ressaltar que, nesse caso, a obesidade por si só, induziu um aumento na frequência de neutrófilos e esse aumento foi significativamente maior nos camundongos obesos infectados sugerindo que a obesidade afeta a frequência de neutrófilos e que esse efeito é potenciado pela infecção (Figura 10B). Já a frequência de monócitos inflamatórios foi similar entre todos os grupos (Figura 10C). Apesar de haver maior frequência de neutrófilos no sangue dos animais obesos, essa diferença não se refletiu no local da lesão, já que na orelha dos animais magros e infectados se observou o oposto.

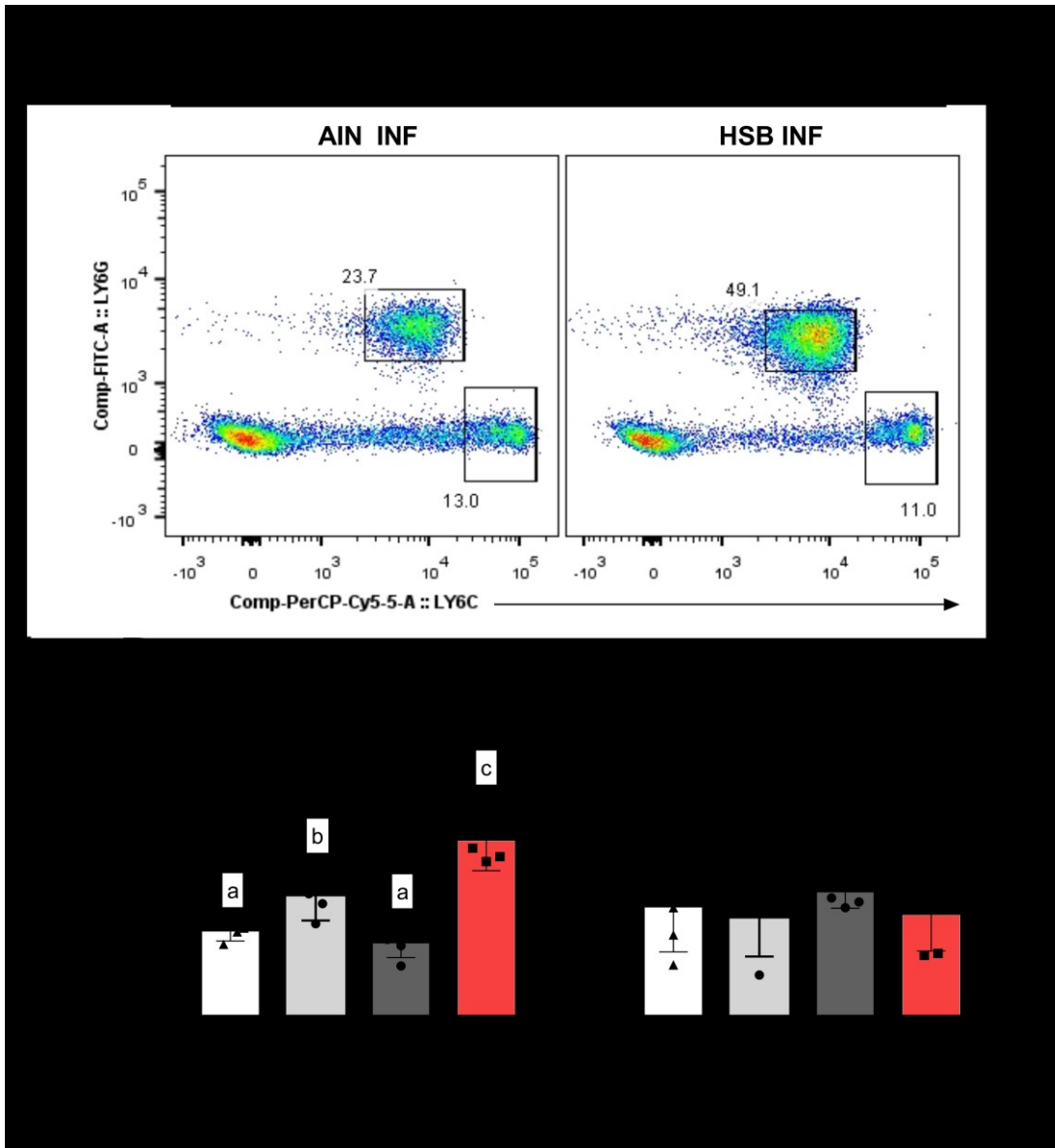


Figura 10. Avaliação da frequência de neutrófilos e monócitos no sangue 2 dias após a infecção. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides no sangue. (A) Gráficos representativos das populações de neutrófilos (Ly6G⁺) e monócitos (LY6C^{hi}) nos grupos AIN e HSB infectados; (B) frequência neutrófilos (Ly6G⁺); (C) frequência de monócitos (Ly6C⁺). A análise estatística foi feita pelo teste *one-way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares com 4-5 camundongos por grupo.

6.5 A obesidade induziu o aumento do número e da frequência de macrófagos e monócitos no tecido adiposo

O contraste entre a frequência de neutrófilos observada na orelha e no sangue dos animais obesos e controle infectados levantou a questão de uma possível deficiência no recrutamento de células imunes para a lesão nos animais obesos infectados. O tecido adiposo é o órgão mais afetado durante a obesidade e grande parte dos efeitos sistêmicos ocorrem a partir de alterações no perfil celular e secretório do órgão, principalmente pelo acúmulo de macrófagos (WEISBERG et al., 2003). Como esperado, os animais alimentados com dieta HSB apresentaram um acúmulo de células CD11b⁺ bem como maior frequência macrófagos no tecido adiposo (Figura 11A e 11B). Além da maior frequência de macrófagos, também foi observada uma maior frequência de monócitos no órgão de animais obesos, independentemente da infecção por *L. major* (Figura 7C). No entanto, quando analisamos a frequência de neutrófilos no tecido adiposo, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (Figura 7E). Dessa maneira, considerando que o número de neutrófilos no tecido adiposo tende a ser muito reduzido, mesmo com a hipertrofia de adipócitos (MOURA SILVA et al., 2018), o acúmulo de monócitos e macrófagos nesse órgão sugere que o tecido adiposo pode ser um centro de recrutamento de células imunes nos animais obesos, dificultando o direcionamento dessas células para o sítio da infecção.

A fim de ampliar a análise das respostas sistêmicas induzidas nos camundongos obesos, a frequência de neutrófilos e monócitos no baço também foi analisada. No entanto, nenhuma diferença foi observada (Figura 11F-G). De modo geral, os dados sugerem que, com 2 dias de infecção, os animais obesos responderam de maneira diferente ao parasito, com menor frequência de neutrófilos no sítio da infecção, mesmo com um cenário de neutrofilia e intenso infiltrado celular no tecido adiposo. Neste caso, o tecido adiposo pode ser peça chave no desenvolvimento dessa resposta alterada frente ao parasito.

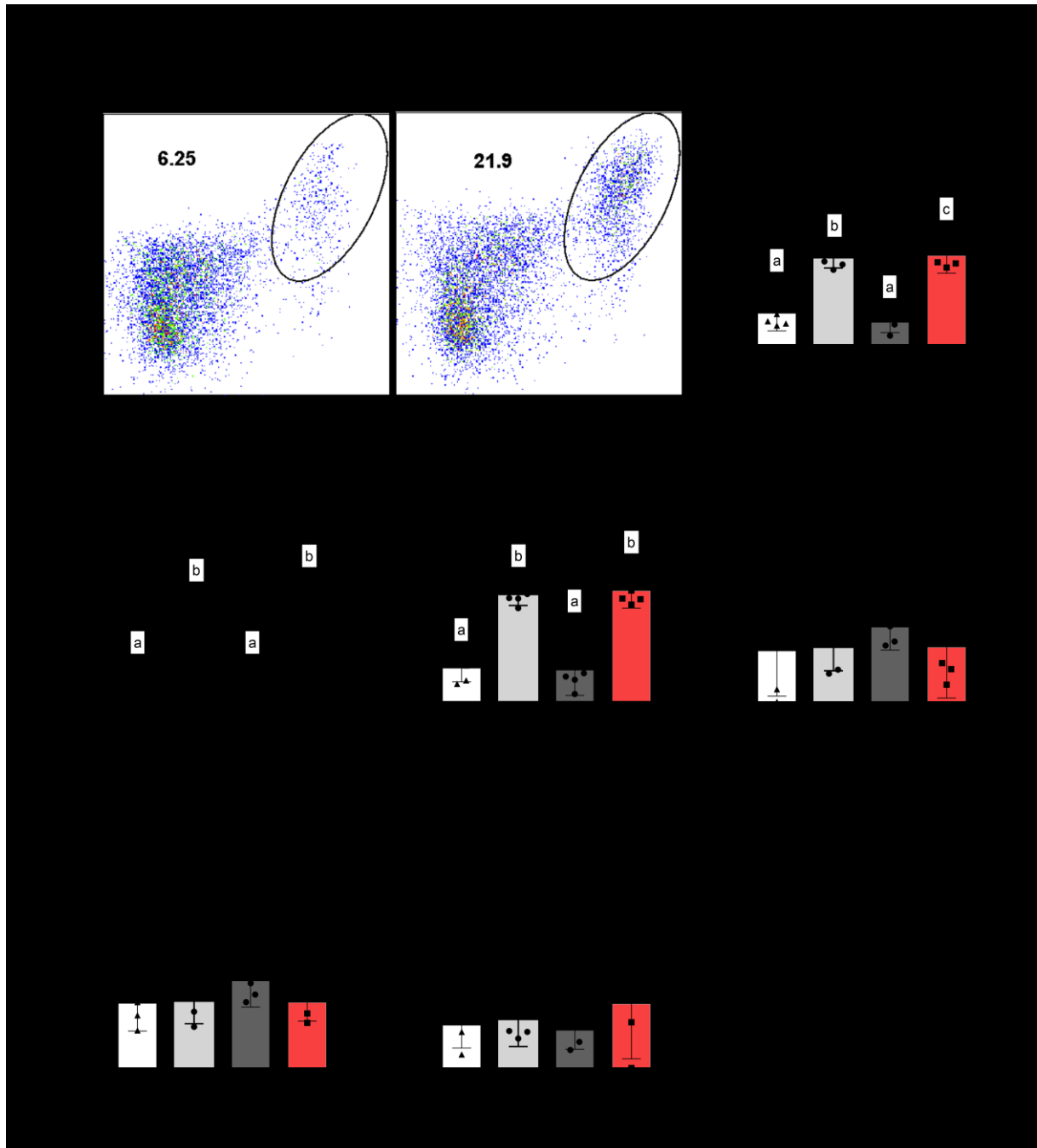


Figura 11: Avaliação da frequência de neutrófilos e monócitos no tecido adiposo e baço de camundongos C57BL/6 2 dias após a infecção com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides no tecido adiposo e baço. (A) Gráficos representativos das populações de macrófagos (CD11b⁺F480⁺) e frequência dessas células no tecido adiposo. (B) contagem de células CD11b⁺ totais no tecido adiposo. (C) Frequência de monócitos (CD11b⁺LY6C⁺) e (D) neutrófilos (Ly6G⁺) tecido adiposo. (E) Frequência de monócitos (CD11b⁺LY6C⁺) e (F)

neutrófilos (Ly6G⁺) no baço. A análise estatística foi feita pelo teste *one way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares com 4-5 camundongos por grupo.

6.6 Os monócitos foram as células predominantes nas lesões 8 semanas após a infecção com *L. major* em camundongos obesos e controles.

Com o intuito de avaliar as populações de neutrófilos e monócitos em um período crônico da lesão, foram analisadas as células infiltrantes nas orelhas infectadas com *L. major* 8 semanas após a infecção. Nesse tempo, os animais do grupo Controle apresentavam lesões menores e menos graves do que os camundongos obesos (Figura 6D).

Verificamos uma drástica alteração no perfil de células em comparação ao tempo de 2 dias. No caso, observamos que cerca de 70% das células CD11b⁺ no sítio da infecção eram positivas para Ly6C⁺CX₃CR1⁺ em ambos os grupos infectados (Figura 12A e 12D). Essa mudança no perfil das células que infiltram as lesões é descrita em momentos iniciais do curso da infecção em C57BL/6 (CHARMOY et al., 2016; ROMANO et al., 2017), porém a permanência ou o constante influxo de monócitos inflamatórios em tempos crônicos de infecção ainda não é amplamente estudado. A contagem de células CD11b⁺ novamente não revelou diferenças entre o número de células recrutadas para a orelha entre animais AIN-INF e HSB-INF, porém, estes apresentaram um infiltrado celular maior do que animais não infectados (Figura 12B). Já em relação aos neutrófilos, observamos ainda uma frequência considerável dessas células nos animais infectados na 8ª semana de infecção, porém não houve diferença entre os grupos AIN e HSB (Figura 12C). Vale destacar que os animais obesos infectados apresentaram uma maior frequência de monócitos de patrulha Ly6C⁻CX₃CR1⁺ (Figura 8E) e de células residentes (Figura 8F) do que os animais AIN-INF.

Esse resultado, além de elucidar qual é o perfil de células da imunidade inata nas lesões de camundongos C57BL/6 oito semanas após a infecção com *L. major*, também identifica alguns subtipos de células que cujas frequências estavam alteradas em animais obesos e poderiam estar relacionadas com a maior suscetibilidade desses animais à leishmaniose cutânea.

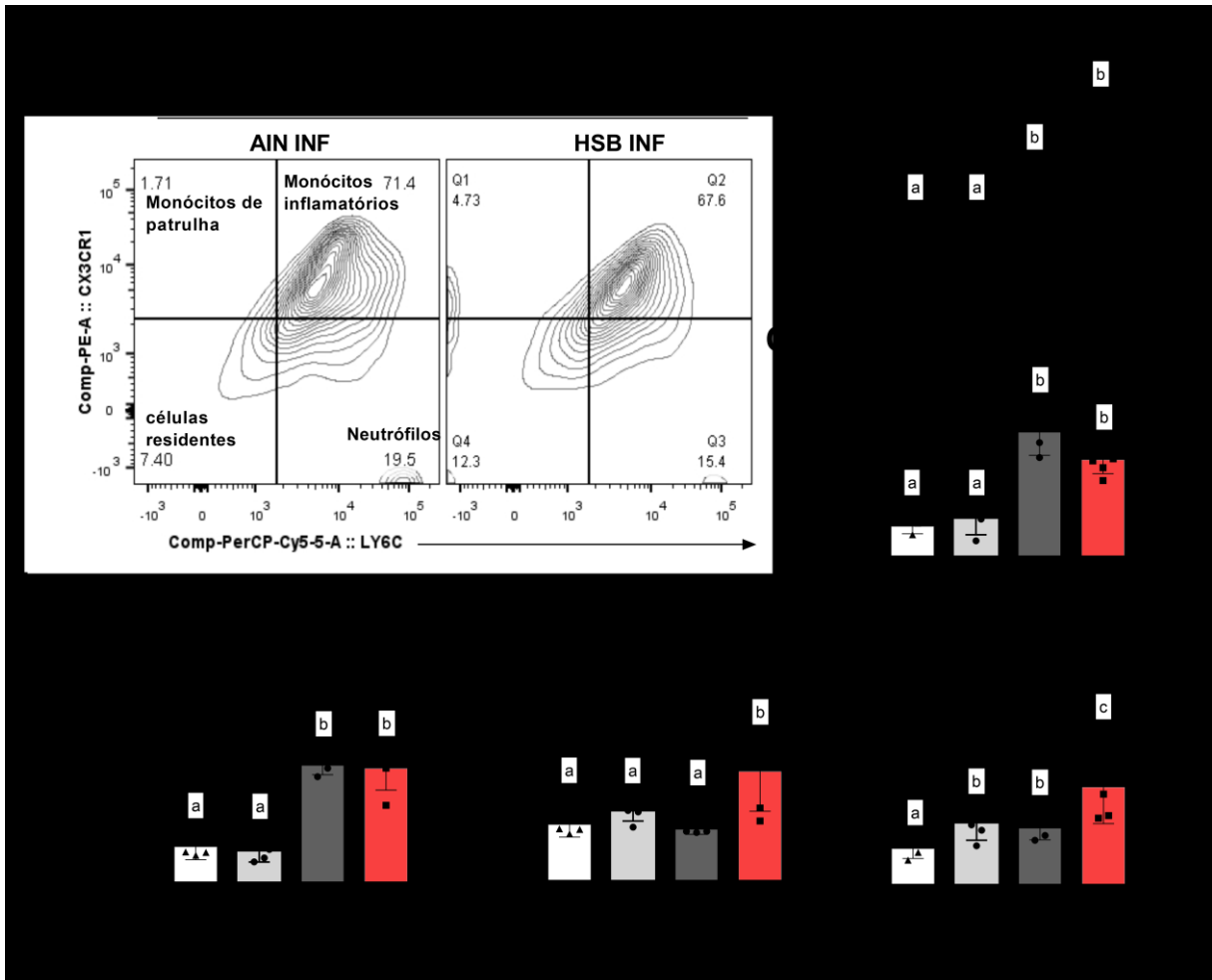


Figura 12: Avaliação da frequência de neutrófilos, monócitos e células residentes nas orelhas de camundongos C57BL/6 oito semanas após a infecção com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides nas orelhas. (A) Gráficos representativos das populações analisadas na orelha 8 semanas após a infecção. (B) contagem de células CD11b⁺ totais. (C) Frequência de Neutrófilos (Ly6C^{int}CX₃CR1⁺). (D) Frequência de monócitos inflamatórios (Ly6C⁺CX₃CR1⁺). (E) Monócitos de patrulha (Ly6C⁻CX₃CR1⁺) e (F) células residentes (Ly6C⁻CX₃CR1⁻). A Análise estatística foi feita pelo teste *one-way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares com 4-5 camundongos por grupo.

6.7 Variações no perfil de células do sangue, do tecido adiposo e do baço 8 semanas após a infecção com *L. major*.

Na tentativa de obter o retrato sistêmico dos efeitos da obesidade sobre as populações de células do sistema inato, realizamos as mesmas análises no tempo de 8 semanas após a infecção para os órgãos previamente abordados.

Diferentemente do que foi observado no tempo de 2 dias, desta vez, no sangue, houve diferença na frequência de neutrófilos no sangue dos animais do grupo HSB-INF quando comparados aos animais do grupo AIN (Figura 13A). Novamente, a frequência de monócitos no sangue se manteve semelhante entre os grupos (Figura 13B). Já em relação ao tecido adiposo, a frequência de macrófagos (CD11b⁺F480⁺) e de monócitos permaneceu maior nos animais obesos, porém, desta vez, os animais controles infectados apresentaram maior frequência dessas células no tecido quando comparados aos animais do grupo AIN (Figura 13C e 13E). Novamente, não houve diferença na frequência de neurófilos no tecido adiposo (Figura 13E), confirmando a baixa frequência dessas populações nesse sítio durante a obesidade crônica. Por fim, 8 semanas após a infecção, detectamos uma maior frequência de monócitos esplênicos em camundongos obesos e infectados por *L. major* (Figura 13F). Já a frequência de neutrófilos foi equivalente em todos os baços analisados (Figura 13G).

Os resultados mostram que houve flutuações na frequência de leucócitos no sangue dos animais obesos nos tempos analisados, porém os animais que ingeriram a dieta HSB e foram infectados aparentemente mantem maior frequência de neutrófilos circulantes durante fases mais crônicas da infecção.

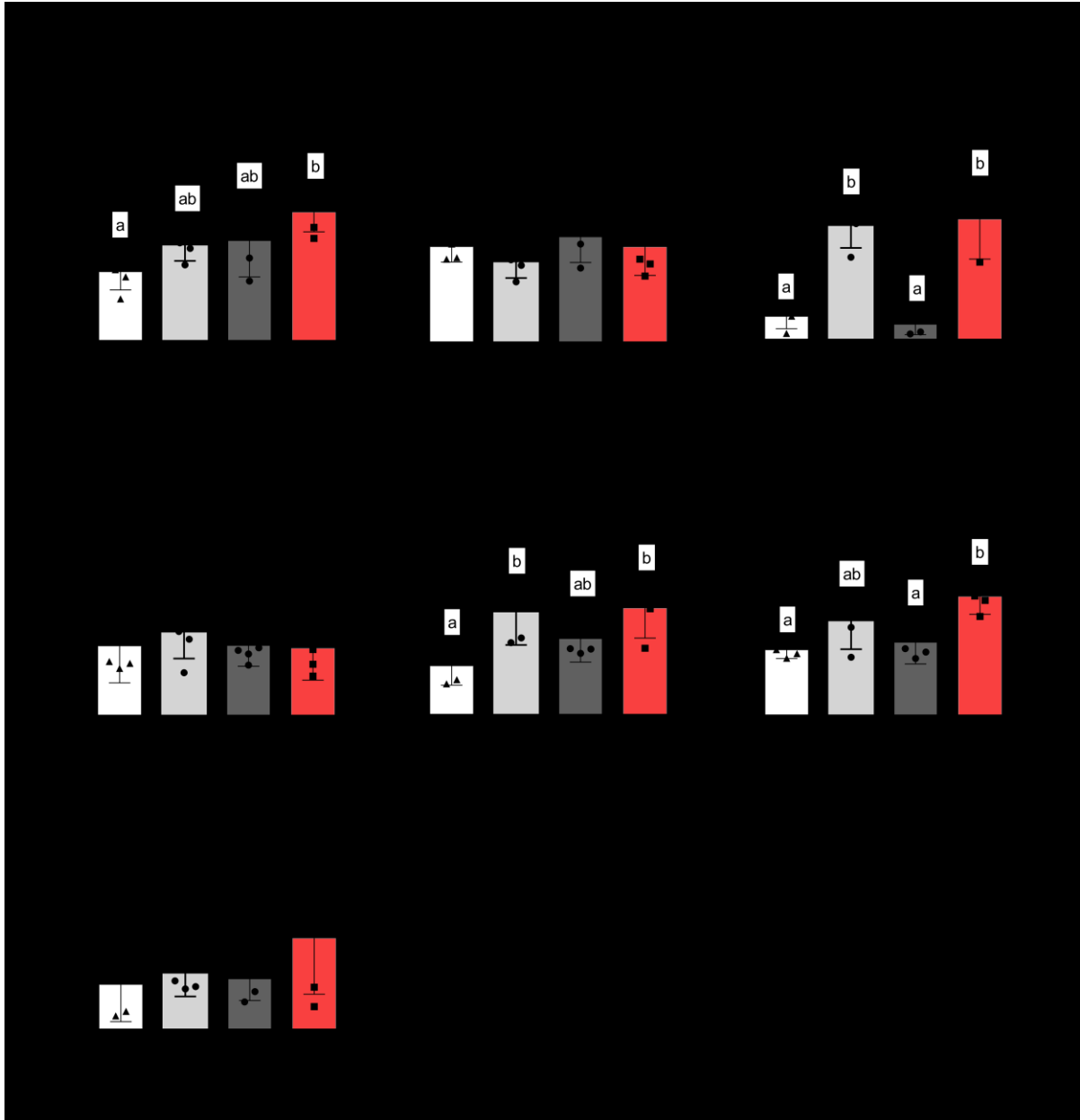


Figura 13: Avaliação da frequência de neutrófilos, macrófagos e monócitos no tecido adiposo, baço e sangue de camundongos C57BL/6 oito semanas após a infecção com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12ª semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides no tecido adiposo, baço e sangue. (A) Frequência neutrófilos (Ly6G⁺) e (B) de monócitos (Ly6C⁺ CX₃CR1⁺) no sangue 8 semanas após infecção. (C) Frequência de macrófagos (CD11b⁺F480⁺), (D) neutrófilos (Ly6G⁺) e (E) monócitos (CD11b⁺LY6C⁺) no tecido adiposo. (F) Frequência de monócitos (CD11b⁺LY6C⁺) e (G) neutrófilos (Ly6G⁺) no baço. A análise estatística foi feita pelo teste *one-way* ANOVA. Os

resultados são representativos de dois experimentos similares com 4-5 camundongos por grupo.

6.8 A obesidade induzida pela dieta HSB resultou no aumento da frequência de células com perfil anti-inflamatório nos baços de camundongos C57BL/6.

O perfil funcional dos macrófagos tem sido descrito como importante para o desfecho de infecções e outros contextos inflamatórios. Receptores expressos em macrófagos e citocinas determinantes desse perfil funcional estão envolvidos no aumento da suscetibilidade à várias espécies de *Leishmania*. Dentre estes, a expressão de receptores envolvidos na fagocitose de parasitos e receptores de reconhecimento de padrões (como os TLRs) são os dos mais estudados no contexto da Leishmaniose cutânea (UENO; WILSON, 2012). As citocinas anti-inflamatórias TGF- β e IL-10 também têm sido descritas como moduladoras da atividade macrofágica em cenários de infecção crônica (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). No entanto, muitos desses marcadores não são costumeiramente associados ou estudados no contexto da obesidade. Deste modo, decidimos avaliar se o perfil de células sistêmicas associado com a obesidade poderia influenciar um possível aumento na suscetibilidade à *L. major* em C57BL/6.

Já foi descrito que a expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR-4), está associada a efeitos reguladores e anti-inflamatórios em modelo de infecção com *L. donovani* (MURRAY et al., 2013). Assim, decidimos avaliar se as células do baço dos animais obesos poderiam apresentar maior frequência de células CD11b⁺TLR-4⁺, fenótipo de macrófagos que poderiam ser incapazes de eliminar o parasito. No entanto, não verificamos diferença entre a frequência de células CD11b⁺TLR-4⁺ no baço de animais obesos e saudáveis infectados ou não (Figura 14A).

O TGF- β é uma importante citocina envolvida na regulação de respostas inflamatórias e na homeostasia do corpo. Porém, a maior produção de TGF- β no contexto da obesidade (SAMAD et al., 1997) poderia se associar à supressão de respostas inflamatórias necessárias para o controle do crescimento de parasitos. O TGF- β é secretado ligado ao peptídeo associado a latência (LAP), e pode ser expresso na membrana celular das células do sistema imune (OIDA; WEINER, 2010). Embora a maior parte dos relatos de células expressando TGF- β de membrana

(LAP+) se concentre na população de células T, trata-se de uma citocina produzida por vários tipos celulares inclusive os macrófagos(MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). De fato, cerca de 5% das células CD11b⁺ do baço também eram LAP⁺, no entanto, não houve diferença entre os animais dos grupos obeso e controle (Figura 14B).

O receptor de manose (CD206) é um marcador clássico de macrófagos com perfil anti-inflamatório importantes no reparo tecidual (STEIN et al., 1992). Embora a obesidade seja frequentemente associada com a inflamação e a com a indução sistêmica de macrófagos inflamatórios, foi possível detectar maior frequência de células CD11b⁺CD206⁺ no baço de animais obesos (Figura 14C). Esses dados sugerem que a obesidade aumentou a frequência de macrófagos com perfil anti-inflamatórios a nível sistêmico.

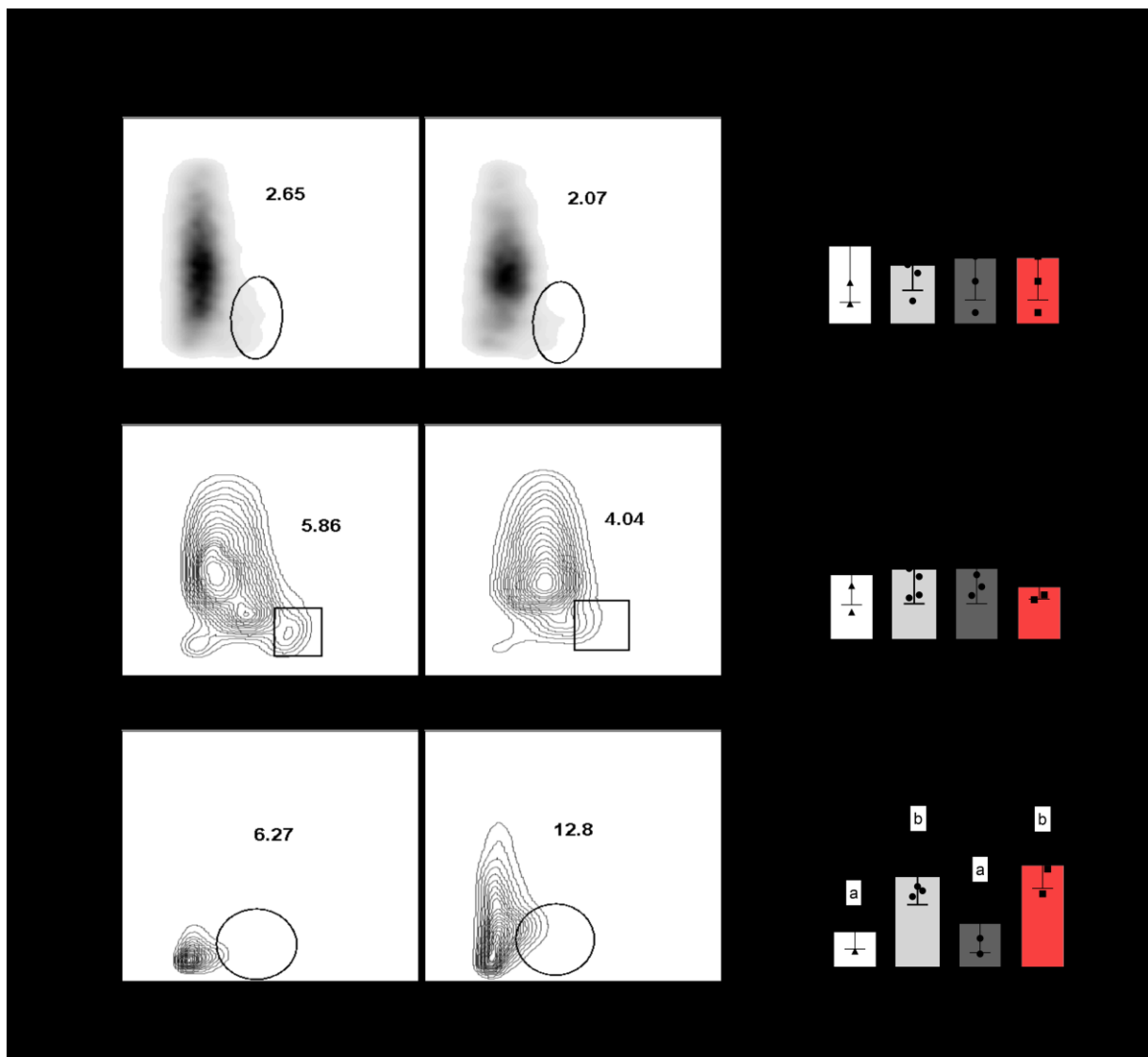


Figura 14: Avaliação da frequência de células CD11b⁺TLR-4⁺, LAP⁺ e CD206⁺ nos baços de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides no baço. (A) Plot representativo e frequência de células CD11b⁺TLR-4⁺ no baço de animais do grupo AIN e HSB. (B) Plot representativo e frequência de células CD11b⁺LAP⁺ no baço de animais do grupo AIN e HSB. (C) Gráfico representativo e frequência de células CD11b⁺CD206⁺ no baço de animais do grupo AIN e HSB. Análise estatística feita pelo teste A análise estatística foi feita pelo teste *one-way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares com 3-5 camundongos por grupo. SSC: *side scatter*

6.9 Camundongos obesos infectados com *L. major* apresentam maior frequência de macrófagos CD11b⁺CD206⁺ nas lesões

A partir da verificação de que animais obesos apresentaram maior frequência de células CD11b⁺CD206⁺ no baço, o próximo passo foi verificar se a frequência de células com fenótipo anti-inflamatório similar poderia estar alterada no sítio da infecção desencadeando uma resposta ineficaz frente ao parasito. Interessantemente, 8 semanas após a infecção, os animais obesos apresentaram maior frequência de células CD206⁺LY6C^{int} do que os animais controles no sítio da infecção (Figura 15A e 15C). Os animais do grupo AIN-INF apresentaram frequência dessas células similar àquela observada nos camundongos dos grupos que não entraram em contato com o parasito. Com 2 dias de infecção, não houve diferença na frequência de células CD11b⁺CD206⁺ nas orelhas dos animais infectados e não infectados (Figura 15B).

Os dados mostram que, além do aumento sistêmico de macrófagos com um fenótipo mais anti-inflamatório (CD11b⁺CD206⁺) nos animais obesos, houve também aumento na frequência dessas células nas orelhas infectadas na 8^a semana de infecção.

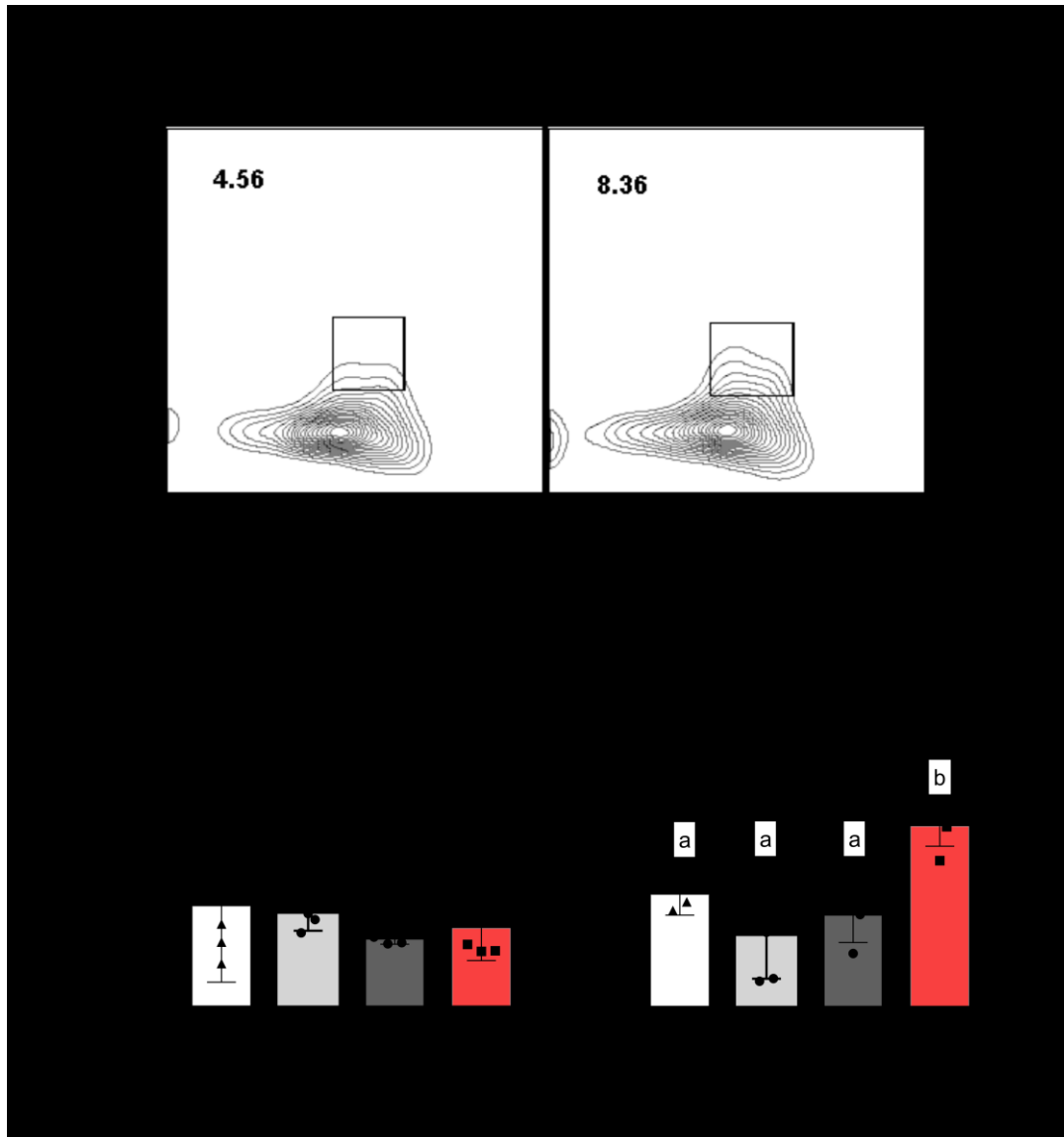


Figura 15: Avaliação da frequência de células Ly6C+CD206⁺ nas orelhas de camundongos C57BL/6 oito semanas após a infecção com *L. major*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas ou desafiados com PBS. As dietas foram mantidas durante todo experimento. Nos tempos 2 dias e 8 semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados para análise das células mieloides na orelha. (A) Gráficos representativos da frequência de células CD11b⁺ Ly6C^{int} CD206⁺ na orelha de camundongos dos grupos AIN-INF e HSB-INF após 8 semanas de infecção. (B) frequência de células Ly6C^{int} CD206⁺ na orelha após 2 dias e (C) 8 semanas de infecção. As análises foram feitas utilizando o teste *one-way* ANOVA. Os resultados são representativos de dois experimentos similares com 4-5 camundongos por grupo.

7 DISCUSSÃO

A obesidade é uma condição associada a distúrbios metabólicos, além de ser considerada um fator de risco para diversas doenças. Muitos estudos que correlacionam a obesidade com infecções, por exemplo, mostram que, na maioria das vezes, as infecções têm pior prognóstico no contexto do excesso de peso (FALAGAS; KOMPOTI, 2006; KARLSSON; BECK, 2010; TORRES et al., 2018). Neste trabalho, confirmamos que a obesidade induzida por dieta hipercalórica também é capaz de induzir lesões mais severas e com maior carga parasitária em animais C57BL/6 infectados com *L. major*. O agravamento da lesão estava relacionado a uma menor frequência de neutrófilos 2 dias após a infecção, bem como ao aumento na frequência de macrófagos anti-inflamatórios 8 semanas após a infecção no sítio da infecção.

Normalmente, se atribui as comorbidades e disfunções associadas à obesidade a um estado de inflamação crônica de baixa intensidade (HOTAMISLIGIL, 2006). A partir do acúmulo excessivo de lipídios e da expansão desordenada do tecido adiposo, ocorre a modificação do perfil celular e secretório desse órgão. Em geral, a literatura descreve adipócitos hipertrofiados como produtores majoritariamente de citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem inflamação sistêmica (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Em um cenário onde a inflamação é sistêmica, seria plausível especular que a obesidade traria benefícios na resposta contra *L. major* já que é descrito que o ambiente inflamatório é essencial para o efeito leishmanicida da indução de células Th1, produção de TNF- α e de NO principalmente por monócitos e macrófagos (HURDAYAL; BROMBACHER, 2017; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Em trabalho prévio do nosso grupo, mostramos que a obesidade induzida em camundongos C57BL/6 por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples e gordura aumenta a suscetibilidade desses animais à infecção por *L. major*, induzindo lesões mais graves e com maior carga parasitária ao final de 8 semanas de infecção. Mais que isso, verificamos que camundongos obesos e infectados apresentaram maiores níveis de IL-17 nos sobrenadantes de cultura de células dos linfonodos drenantes, bem como maior atividade da Arginase 1 e maior produção de NO (MAIOLI et al., 2018). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi buscar entender quais células poderiam estar envolvidas com o aumento da susceptibilidade nos camundongos obesos.

O trabalho em que a dieta HSB foi descrita, uma dieta rica em açúcar e lipídios a qual mimetiza de maneira mais realista o padrão alimentar ocidental, mostrou que, além de induzir a obesidade em camundongos, ela foi capaz de reduzir a frequência de células Tregs no tecido adiposo dos animais (MAIOLI et al., 2016). Outros modelos de obesidade também mostraram que as Tregs estão reduzidas no tecido adiposo dos animais obesos (FEUERER et al., 2009). As células Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ são fundamentais no controle da homeostasia corporal, atuando na regulação das células T efetoras inflamatórias, suprimindo as respostas imunes a auto componentes e balanceando respostas inflamatórias frente a antígenos exógenos (SAKAGUCHI, 2004). Diferentemente do contraste observado nas populações do tecido adiposo, apenas com o tratamento dietético, não foi possível verificar diferença significativa nas populações de Treg do baço. No entanto, os linfonodos auriculares de camundongos do grupo HSB apresentaram maior frequência de Tregs, em comparação com os animais AIN. Com a infecção, não houve diferença entre os grupos nos tempos analisados. Dessa forma, a obesidade foi capaz de modificar as frequências de Tregs de acordo com o órgão analisado, porém os nossos dados indicam que as células T CD4⁺ FOXP3⁺ não influenciaram na redução da resistência exibida pelos camundongos C57BL/6 com excesso de peso à infecção por *L. major*.

Os neutrófilos têm papel fundamental na resposta aguda contra diferentes patógenos. Essas células chegam minutos após uma lesão com dano tecidual ou após o contato com um antígeno e possuem meia-vida curta. Os neutrófilos auxiliam no estabelecimento inicial da inflamação, liberando conteúdo granular, quimiocinas e realizando fagocitose (KRUGER et al., 2015). São células que realizam também apoptose rapidamente (CHARMOY et al., 2010). Nas Leishmanioses, os neutrófilos são células fundamentais na definição de resistência ou susceptibilidade. De modo geral, a depleção de neutrófilos em fases agudas da infecção, parece aumentar a gravidade da lesão em modelos de infecção com camundongos que desenvolvem respostas predominante Th2 (CHEN et al., 2005; SOUSA et al., 2014; TACCHINI-COTTIER et al., 2000). No que tange a infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, os neutrófilos já foram chamados de “Cavalos de Tróia” já que, quando infectados, poderiam permanecer de forma silenciosa no sítio da infecção até serem fagocitados por monócitos, macrófagos ou células dendríticas (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; RIBEIRO-GOMES et al., 2012). Além disso, neutrófilos isolados de camundongos infectados com *L. major* são capazes de gerar

lesões quando injetados em camundongos *naive* e a depleção dessas células também é capaz de aumentar a resistência de camundongos C57BL/6 à infecção (PETERS et al., 2008). De maneira interessante, apesar da obesidade aumentar a gravidade da lesão, encontramos maior frequência de neutrófilos na orelha dos animais controle infectados (2 dias após a infecção). A menor frequência de neutrófilos nos obesos pode indicar que esses animais apresentam dificuldade no recrutamento dessas células para lesões específicas. Outra possibilidade é que a obesidade predispõe os neutrófilos a acelerarem o seu programa de morte celular. Dessa forma, os neutrófilos não parecem ser peças chave no aumento da susceptibilidade dos camundongos obesos à infecção por *L. major*.

Com intuito de analisar as populações de neutrófilos numa fase crônica da infecção, estendemos as análises feitas com 2 dias para o tempo de 8 semanas. Tem sido demonstrado que, após a primeira onda de neutrófilos recrutados logo após o inóculo intradérmico de *L. major*, ondas secundárias de migração dessas células surgem ao longo do curso da infecção e estão envolvidas com a maior suscetibilidade à leishmaniose cutânea (CHARMOY et al., 2016; PENICHE et al., 2017; RIBEIRO-GOMES et al., 2012). De fato, verificamos, tanto nos animais obesos quanto nos magros, frequências significativas de neutrófilos nas lesões não havendo, porém, diferenças entre os grupos. Cabe ainda elucidar qual o papel das ondas secundárias de neutrófilos na lesão, bem como quais são os produtos de degranulação dessas células envolvidos na resposta imune durante a fase crônica da leishmaniose cutânea.

Com base principalmente no resultado da frequência de neutrófilos no sítio da infecção, partimos para verificar se esse efeito poderia ser sistêmico. Alguns estudos apontam a obesidade como causadora de leucocitose e, mais especificamente, de neutrofilia em humanos (DIXON; O'BRIEN, 2006; HERISHANU et al., 2006). Nossos dados também mostram maior frequência de neutrófilos no sangue dos camundongos obesos, principalmente dois dias após a inoculação do parasito. Além disso, a maior frequência de monócitos no baço com assinatura genética praticamente idêntica àquela dos monócitos sanguíneos (SWIRSKI et al., 2009) sugere que os animais obesos realmente apresentam leucocitose. Sendo assim, apesar do grupo HSB possuir maior frequência de neutrófilos no sangue, o mesmo não foi observado na pele. Essa discrepância reforçou a sugestão de que poderia haver algum comprometimento no recrutamento dos neutrófilos para o sítio da infecção. Nesse contexto, o tecido adiposo seria um potencial sítio de sequestro dessas células

impedindo sua migração para um sítio inflamado, já que, como bem descrito, o tecido adiposo hipertrófico apresenta um infiltrado de células muito maior do que o tecido adiposo de animais eutróficos (WEISBERG et al., 2003). De fato, confirmamos que camundongos obesos apresentam maior infiltrado celular de monócitos e macrófagos do que os animais magros, porém detectamos baixa frequência de neutrófilos no sítio da infecção.

Com relação aos neutrófilos, o tecido adiposo apresenta um aumento transiente na população dessas células em momentos precoces do estabelecimento da obesidade (ELGAZAR-CARMON et al., 2008). No entanto, a presença de neutrófilos no tecido adiposo durante a obesidade crônica é mínima (MOURA SILVA et al., 2018; TALUKDAR et al., 2012), sugerindo que essas células pavimentam o caminho para o recrutamento de monócitos que futuramente poderão se diferenciar em macrófagos de acordo com os estímulos do microambiente local. Corroborando esses dados, verificamos baixas populações de neutrófilos no tecido adiposo em nosso modelo. Para verificar se o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção está realmente afetado, seria interessante utilizar a microscopia intra-vital em camundongos transgênicos expressando marcadores fluorescentes para detecção de neutrófilos e monócitos. Desse modo, seria possível rastrear as células no momento da infecção e, ao mesmo tempo, observar se o tecido adiposo atuaria como um competidor de sinais inflamatórios retendo o fluxo de neutrófilos que poderiam ir para outro sítio específico.

Os monócitos são células que circulam pelo sangue e que, na presença determinados estímulos, podem migrar para um determinado tecido e mudar seu fenótipo em resposta a esses estímulos (JAKUBZICK; RANDOLPH; HENSON, 2017; TAMOUTOUNOUR et al., 2013). Recentemente, tem-se definido um papel mais ativo para essas células no combate a infecções. Já está bem descrito que essas células expressam iNOS e, mediante a produção de NO, podem promover a eliminação de *L. major* (GONCALVES et al., 2011; ROMANO et al., 2017). Em camundongos C57BL/6, foi mostrado que uma onda de monócitos (Ly6C⁺Cx3CR1⁺) chega no sítio do inóculo cerca de 48 horas após a infecção, substituindo a grande população de neutrófilos que se estabelece a partir dos primeiros momentos da infecção e sendo capazes de fagocitar parasitos ou serem ativamente infectadas por *L. major* (ROMANO et al., 2017). Apesar de serem apontadas como células fundamentais na fase aguda da infecção, não detectamos diferença entre a frequência de monócitos na orelha de

animais obesos e magros. Levando em consideração que não foi realizado um estudo cinético detalhada das frequências dessas células nos vários sítios, não se pode afirmar que a obesidade não comprometeu o fluxo inicial de células para o local da infecção.

No modelo de resistência para *L. major* com camundongos C57BL/6, as lesões intradérmicas começam a curar espontaneamente por volta da 6-8ª semana. Durante esse período, células da imunidade adaptativa, células dendríticas, macrófagos e monócitos atuam na manutenção de um ambiente inflamatório que leva à redução da lesão juntamente com a redução da carga de parasitos no local da infecção (BELKAID et al., 2000).

No estudo de Romano e colaboradores (2017) utilizando a mesma linhagem de camundongo (C57BL/6) e a mesma dose de *L. major* que usamos neste trabalho, foi demonstrado que o influxo de monócitos inflamatórios para a lesão é crescente até o 14º dia de infecção (ROMANO et al., 2017). Além do mais, foi ressaltado que, em casos de reinfeção pelo parasito, esses monócitos chegam em maior número e mais rapidamente no sítio da lesão sendo uma das células responsáveis pela eficiente reposta contra o parasito no segundo inóculo. No presente trabalho, encontramos, no 2º dia e na 8ª semana de infecção, uma frequência de populações de monócitos inflamatórios aumentada independentemente da dieta consumida pelo grupo infectado. Vale ressaltar que, na 8ª semana de infecção, a frequência dessas células foi muito mais expressiva. Esse resultado ressalta a importância desses monócitos no combate à *L. major* não só nos tempos iniciais da infecção, mas também em tempos mais tardios. Apesar disso, a obesidade não impactou na frequência dessas células e estudos posteriores serão necessários para definir melhor a função e o fenótipo dessas células no contexto de infecções. Além do mais, foi possível detectar, nos animais obesos, uma maior frequência de monócitos de patrulha (CD11b⁺Ly6C⁻CX₃CR1⁺) e de células residentes (CD11b⁺Ly6C⁻CX₃CR1⁻) 8 semanas após a infecção por *L. major*. A ausência ou baixa expressão de Ly6C pelas células identificadas nas lesões indicou que estas eram macrófagos teciduais residentes ou monócitos/macrófagos que estavam há mais tempo no local e que possuíam assinatura genética anti-inflamatória e morfologia diferente dos monócitos inflamatórios (TAMOUTOUNOUR et al., 2013). O aumento da frequência dessas células nos animais obesos em fases crônicas da infecção indica que estas poderiam

representar populações incapazes de matar os parasitos estando, portanto, envolvidas no aumento da susceptibilidade à infecção.

Tem sido demonstrado que a obesidade induz uma alteração no perfil celular do tecido adiposo (CASTOLDI et al., 2015; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). No entanto, o impacto do consumo de dietas hipercalóricas vai além do nicho específico do tecido adiposo, sendo necessário o melhor entendimento do papel da obesidade na alteração de perfis celulares em outros órgãos do corpo.

Foi descrito que as alterações observadas no tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade são precedidas por alterações no intestino. Especificamente, o aumento da permeabilidade intestinal e a ativação de macrófagos do cólon pelos componentes da dieta é capaz de induzir a diferenciação de macrófagos com perfil pró-inflamatório no tecido adiposo, os quais medeiam a resistência à insulina (KAWANO et al., 2016). Outro estudo também mostrou um efeito sistêmico do excesso de peso sobre a população de macrófagos peritoneais, os quais tiveram sua capacidade de adesão celular aumentada (SANTOS et al., 2016).

Dessa forma, decidimos verificar se o baço de animais obesos apresentava perfis celulares distintos de macrófagos. Cabe ressaltar, que a partir do momento em que marcadores fenotípicos que indicam estágios mais avançados de diferenciação foram empregados em células mieloides CD11b⁺, estas células passaram a ser designadas como macrófagos. Para caracterizar essas populações diferentes, utilizamos, como marcadores, alguns receptores envolvidos na fagocitose de *Leishmania*, bem como receptores típicos de macrófagos com propriedades anti-inflamatórias como o receptor de manose CD206 (SHIMADA et al., 2006) e o TLR-4 (UENO; WILSON, 2012). Também decidimos avaliar a frequência de células CD11b⁺LAP⁺ em nosso modelo, já que a obesidade é associada com um aumento na produção de TGF- β (SAMAD et al., 1997). Interessantemente, observamos que os animais que consumiram a dieta HSB apresentaram maior frequência de células CD11b⁺CD206⁺ no baço, o que poderia indicar um aumento sistêmico de células com perfil anti-inflamatório e incapazes de eliminar o parasito.

O aumento da expressão do receptor de manose em macrófagos estimulados com citocinas anti-inflamatórias foi um dos primeiros passos na definição de marcadores clássicos de macrófagos com funções anti-inflamatórias definidos como macrófagos alternativamente ativados (STEIN et al., 1992). Estudos posteriores confirmaram que essas populações eram imprescindíveis na manutenção da

homeostasia, sendo excelentes células endocíticas, fundamentais para o reparo tecidual e atuantes no processo de fagocitose de *Leishmania* (LEE et al., 2018b; LOKE et al., 2002). A observação do aumento da frequência de células residentes (CD11b⁺Ly6C⁻CX₃CR1⁻) no sítio da infecção (oito semanas após infecção) juntamente com o aumento na porcentagem de células CD11b⁺CD206⁺ no baço dos animais obesos, sugeriu que populações maduras de macrófagos com perfil funcional ligado ao reparo tecidual poderiam estar aumentadas nos camundongos obesos mais especificamente no sítio da infecção.

Foi demonstrado que a cepa *L. major* (Seidman [*LmSd*]), a qual induz lesões cutâneas graves e incuráveis em camundongos C57BL/6, infecta preferencialmente macrófagos dermais residentes com alta expressão do receptor de manose e que a depleção desses macrófagos gera lesões que cura espontaneamente (LEE et al., 2018b). A origem de macrófagos dermais têm sido alvo de debate. De fato, trabalhos anteriores mostraram uma origem mista dessas células, sendo parte originada do saco vitelínico durante a gestação e outra parte vinda de monócitos sanguíneos, as quais poderiam adquirir fenótipos de células residentes (TAMOUTOUNOUR et al., 2013). No entanto, o trabalho de Lee (2018) mostrou, por vários métodos diferentes, que os macrófagos com alta expressão de CD206 na pele são minimamente repovoados por monócitos, sendo majoritariamente de origem fetal (LEE et al., 2018b). No entanto, esse estudo foi feito com camundongos eutróficos. Nossa hipótese é que a obesidade poderia criar um ambiente favorável à diferenciação de macrófagos com esse fenótipo já que, além de verificar maior frequência de células CD11b⁺CD206⁺ no baço, também verificamos maior frequência de células CD11b⁺Ly6C^{int}CD206⁺ na orelha infectada dos camundongos obesos. Esse aumento inesperado de células anti-inflamatórias e de reparo tecidual pode estar relacionado ao aumento da suscetibilidade à infecção por *L. major* observada nos animais obesos. Dessa forma, um próximo passo será estabelecer a origem das populações de células analisadas, de modo a verificar se a obesidade de fato induziu uma diferenciação de monócitos para macrófagos CD206⁺ no sítio da lesão.

Os dados anteriores do nosso grupo mostraram que, no contexto da obesidade, macrófagos peritoneais apresentavam uma resposta inflamatória não convencional, com simultâneo aumento da atividade da arginase e produção de NO, além de elevada produção sistêmica de IL-17 e de imunoglobulinas específicas para *L. major*. Esse comportamento “dual” dos macrófagos levantou a questão de que os estímulos

presentes em animais obesos podem não ser unicamente pró-inflamatórios como descrito em grande parte da literatura relacionada ao tema. Foi demonstrado, em BMDMs, que a adição de TNF- α é capaz de inibir a expressão de Arginase 1, de maneira dose dependente, em monócitos ativados com IL-4, além de promover, nessas células, a expressão da enzima NOS2. De fato, é necessário um ambiente inflamatório para a indução da produção de óxido nítrico (SCHLEICHER et al., 2016). Deste modo, parece que os estímulos presentes no organismo do obeso, incluindo as citocinas e adipocinas produzidas, são capazes de ativar as células do sistema imune de uma maneira não convencional. A maior frequência de macrófagos anti-inflamatórios nos baços e nas lesões dos animais obesos sugerem que a obesidade induzida pela dieta HSB não está associada com um ambiente exclusivamente inflamatório.

Recentemente, a visão quase canônica de que a obesidade está associada a um ambiente pró-inflamatório tem sido questionada. Trabalhos do grupo de Lev Becker mostram que macrófagos diferenciados a partir de células da medula óssea (BMDM) estimulados com FFA, glicose e insulina (estímulos abundantes no microambiente do tecido adiposo de indivíduos obesos) tornam-se células com perfil diferente de macrófagos ativados com LPS e INF- γ que tendem ser associados com a obesidade (COATS et al., 2017; KRATZ et al., 2014). Macrófagos “metabolicamente ativados” possuem um perfil intermediário de inflamação e exibem marcadores como o receptor CD36 do tipo *scavenger* que atua na absorção de ácidos graxos de cadeia longa (KRATZ et al., 2014). Ainda, trabalhos com adipócitos *in vitro* demonstram que adipócitos hipertróficos, ricos em lipídios, induzem resistência à insulina, independente de inflamação (KIM et al., 2015). Por fim, uma criteriosa caracterização junto com o sequenciamento de diversos subtipos de células do tecido adiposo definiu populações com assinatura genética anti-inflamatória como sendo predominantes tanto em camundongos obesos quanto em camundongos saudáveis (MOURA SILVA et al., 2018).

Nesse contexto, fica clara a ideia de que a obesidade altera o perfil de resposta imunológica do organismo, porém, é difícil precisar um tipo específico de resposta que está associada a ela. Na leishmaniose cutânea, detectamos que a obesidade induzida por dieta HSB foi capaz de alterar a frequência de células mieloides (neutrófilos) em tempos precoces de infecção, além de induzir em fases crônicas um aumento na frequência de macrófagos com assinatura anti-inflamatória, que normalmente não são

associadas com a obesidade. Essas células são incapazes de reduzir a carga parasitária no sítio de infecção e poderiam estar relacionadas, assim, às lesões mais graves observadas nos camundongos C57BL/6 obesos.

8 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou as populações de células Treg, neutrófilos, monócitos e macrófagos em diferentes órgãos de camundongos C57BL/6 obesos infectados com *L. major*. Esses camundongos apresentaram lesões maiores e com maior carga de parasitos do que os animais com peso normal ao final de 8 semanas de infecção. Foi verificado que, 2 dias após a infecção, os animais obesos tiveram menor frequência de neutrófilos no sítio da infecção, apesar desses animais apresentarem maior frequência de neutrófilos no sangue, bem como maior infiltrado celular no tecido adiposo. Além disso, os animais obesos apresentaram maior frequência de células mieloides com assinatura anti-inflamatória no baço (CD11b⁺CD206⁺) e no sítio da infecção (CD11b⁺Ly6C^{int}CD206⁺), sugerindo que a obesidade altera o perfil de células na lesão e eleva a frequência de macrófagos que podem ter um perfil ineficaz no controle da *L. major*.

9 PERSPECTIVAS

- 1- Validar por qPCR a expressão de marcadores anti-inflamatórios e inflamatórios no sítio da lesão (Fizz, iNOS, Arginase, IL-10, IL-4).
- 2- Fazer a separação, por *FACS cell sorter*, de células CD11b⁺CD206⁺, infectá-las com *L. major*, *in vitro*, e analisar o índice de infecção.
- 3- Realizar experimento *in vitro*, diferenciando BMDMs com estímulos presentes no sangue de animais obesos, infectar as células com *L. major* e analisar o perfil da infecção e da diferenciação dessas células.
- 4- Realizar um experimento, utilizando microscopia intravital, com camundongos C57BL/6 GFP para Cx₃Cr1, utilizando *Leishmania major*-RFP, para fazer a captura de imagens das células nos tempos mais agudos de infecção no local da lesão.
- 5- Verificar se a obesidade aumenta a taxa de apoptose de neutrófilos.
- 6- Avaliar a expressão de CD36 nas células da orelha infectada de camundongos obesos.
- 7- Realizar transferência de monócitos dos camundongos C57BL/6 obesos CD45.1 para camundongos magros infectados CD45.2 e analisar se essas células repovoam os macrófagos dermais.

10 REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C. et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 263, n. 5144, p. 235–7, 14 jan. 1994.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AO, M. et al. Infection with *Porphyromonas gingivalis* Exacerbates Endothelial Injury in Obese Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110519, 21 out. 2014.
- BACELLAR, O. et al. **Interleukin-12 Restores Interferon- γ Production and Cytotoxic Responses in Visceral Leishmaniasis***The Journal of Infectious Diseases*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-abstract/173/6/1515/1010205>>. Acesso em: 3 jan. 2019.
- BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 257, n. 5069, p. 545–8, 24 jul. 1992.
- BATES, P. A. **Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies***International Journal for Parasitology* Elsevier, , ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517415>>. Acesso em: 3 jan. 2019
- BELKAID, Y. et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000.
- BELKAID, Y. et al. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 8, p. 3992–4000, 15 abr. 2002a.
- BELKAID, Y. et al. CD4⁺CD25⁺regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 5 dez. 2002b.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 127, n. 1, p. 23–35, mar. 2003.
- BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, D. DE V. DAS D. T. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. [s.l: s.n.].
- CANCELLO, R. et al. Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1554–1561, 1 jun. 2006.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004.
- CARNEIRO, M. B. H. et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 1, p. 196 LP-208, 1 jan. 2018.
- CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–25, abr. 1994.
- CASTOLDI, A. et al. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in**

Immunology, v. 6, p. 637, 2015.

CHARMOY, M. et al. Neutrophil-Derived CCL3 Is Essential for the Rapid Recruitment of Dendritic Cells to the Site of *Leishmania major* Inoculation in Resistant Mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000755, 5 fev. 2010.

CHARMOY, M. et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 897–911, abr. 2016.

CHEN, L. et al. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 109–118, jun. 2005.

CHO, K. W.; MORRIS, D. L.; LUMENG, C. N. Flow Cytometry Analyses of Adipose Tissue Macrophages. **Methods in Enzymology**, v. 537, p. 297–314, 2014.

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

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, nov. 2005.

COATS, B. R. et al. Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. **Cell reports**, v. 20, n. 13, p. 3149–3161, set. 2017.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. Plasmodium berghei ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 545–548, 2015.

DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell host & microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, 10 jan. 2018.

DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

DIXON, J. B.; O'BRIEN, P. E. Obesity and the white blood cell count: Changes with sustained weight loss. **Obesity Surgery**, v. 16, n. 3, p. 251–257, 1 mar. 2006.

ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 9, p. 1894–1903, set. 2008.

ENDO, Y. et al. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. **Cell Rep**, v. 12, n. 6, p. 1042–1055, 2015.

FALAGAS, M. E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 438–446, 2006.

FARNSWORTH, C. W. et al. A Humoral Immune Defect Distinguishes the Response to *Staphylococcus aureus* Infections in Mice with Obesity and Type 2 Diabetes from That in Mice with Type 1 Diabetes. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 6, p. 2264–2274, 12 jun. 2015.

FEUERER, M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 930–939, 2009.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, 2007.

FRAYN, K. N. et al. Integrative physiology of human adipose tissue. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International**

- Association for the Study of Obesity**, v. 27, n. 8, p. 875–888, ago. 2003.
- FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature medicine**, v. 1, p. 1311–1314, 1995.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, p. 763–770, 1998.
- GESTA, S.; TSENG, Y.-H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242–256, out. 2007.
- GOMEZ-HERNANDEZ, A. et al. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **International journal of endocrinology**, v. 2016, p. 1216783, 2016.
- GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 6 jun. 2011.
- HE, Q. et al. Regulation of HIF-1{alpha} activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 300, n. 5, p. E877-85, maio 2011.
- HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505–9, 1 maio 1993.
- HERISHANU, Y. et al. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. **European Journal of Haematology**, v. 76, n. 6, p. 516–520, jun. 2006.
- HOLLAND, W. L. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nature Medicine**, v. 17, p. 55, dez. 2010.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nature Reviews: Immunology**, v. 8, n. 12, p. 923–934, 2008.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.
- HRUBY, ADELA; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.
- HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. Interleukin-4 receptor alpha: From innate to adaptive immunity in murine models of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, 2017.
- JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349–362, 2017.
- JUNG, H.; NAM, H.; SUH, J.-G. Rapid and efficient identification of the mouse leptin receptor mutation (C57BL/KsJ-db/db) by tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) analysis. **Laboratory animal research**, v. 32, n. 1, p. 70–73, 2016.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 2001.
- KARLSSON, E. A.; BECK, M. A. The burden of obesity on infectious disease. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 235, n. 12, p. 1412–1424, 2010.
- KARLSSON, E. A.; SHERIDAN, P. A.; BECK, M. A. Diet-Induced Obesity Impairs the T Cell Memory Response to Influenza Virus Infection. **The Journal of Immunology**,

- v. 184, n. 6, p. 3127 LP-3133, 15 mar. 2010.
- KAWANO, Y. et al. Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 2, p. 295–310, 9 ago. 2016.
- KHAN, T. et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 6, p. 1575–1591, 2009.
- KIM, J. I. et al. Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 10, p. 1686–1699, 2015.
- KOPF, M. et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 1127–36, 1 set. 1996.
- KRATZ, M. et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 614–625, 2014.
- KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004651, 12 mar. 2015.
- KULENKAMPFF, E.; WOLFRUM, C. Proliferation of nutrition sensing preadipocytes upon short term HFD feeding. **Adipocyte**, p. 1–10, 29 set. 2018.
- KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, set. 2016.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. **Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?** **Trends in Microbiology**, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781523>>. Acesso em: 20 dez. 2018
- LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.
- LEE, S. H. et al. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 357 LP-375, 2 jan. 2018a.
- LEE, S. H. et al. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 357 LP-375, 2 jan. 2018b.
- LOKE, P. et al. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC immunology**, v. 3, p. 7, 4 jul. 2002.
- LOURADOUR, I. et al. The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. **Cellular microbiology**, v. 19, n. 10, 2017.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.
- MAIOLI, T. U. et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. **Inflammation Research**, v. 65, n. 2, p. 169–178, 2016a.
- MAIOLI, T. U. et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. **Inflammation Research**, v. 65, n. 2, p. 169–178, 2016b.
- MAIOLI, T. U. et al. Obesity impairs resistance to *Leishmania major* infection in

- C57BL/6 mice (under review). **bioRxiv**, 1 jan. 2018.
- MANCUSO, P. et al. Leptin-Deficient Mice Exhibit Impaired Host Defense in Gram-Negative Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 4018 LP-4024, 15 abr. 2002.
- MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, set. 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL 2016**. [s.l.: s.n.].
- MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 121, 2012.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–57, 1 abr. 1986.
- MOURA SILVA, H. et al. Vasculature-associated adipose tissue macrophages dynamically adapt to inflammatory and metabolic challenges. **bioRxiv**, p. 336032, 1 jan. 2018.
- MURAILLE, E. et al. Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to *Leishmania major* Infection Associated with a Polarized Th2 Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4237 LP-4241, 15 abr. 2003.
- MURRAY, H. W. et al. Regulatory actions of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* infection in the liver. **Infection and immunity**, v. 81, n. 7, p. 2318–26, jul. 2013.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Crucial role of the central leptin receptor in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 7, p. 1104–1113, 2010.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 830–840, 2012a.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634–643, 2012b.
- NAGAJYOTHI, F. et al. High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3118, 2014.
- NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–259, 24 maio 2015.
- OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.
- PARK, A.; KIM, W. K.; BAE, K.-H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 1, p. 33–42, 26 jan. 2014.
- PENICHE, A. G. et al. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017.
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891,

p. 970–974, 15 ago. 2008.

PETERS, N. C. et al. Chronic Parasitic Infection Maintains High Frequencies of Short-Lived Ly6C+CD4+ Effector T Cells That Are Required for Protection against Re-infection. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004538, 4 dez. 2014.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis.

Journal of Clinical Investigation, v. 91, n. 4, p. 1390–1395, 1993.

REEVES; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to Leishmania Major. **Annual Review of Immunology**, v. 13, n. 1, p. 151–177, abr. 1995.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 1 set. 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of Leishmania major through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 179, n. 6, p. 3988–94, 15 set. 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23668–23678, 2004.

ROMANO, A. et al. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intraphagosomal pathogen Leishmania major. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006479, 30 jun. 2017.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SAMAD, F. et al. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 3, p. 37–48, 1997.

SANTOS, E. W. et al. High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. **Nutrire**, v. 41, n. 1, p. 6, 28 dez. 2016.

SARNÁGLIA, G. D. et al. Diet-induced obesity promotes systemic inflammation and increased susceptibility to murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 143, n. 12, 2016.

SATO, N. et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p. 205–18, 17 jul. 2000.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to

- Leishmania major in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–77, 1 ago. 1993.
- SCHLEICHER, U. et al. TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. **Cell Reports**, v. 15, n. 5, p. 1062–1075, 3 maio 2016.
- SCHUTZE, S. et al. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced “acidic” sphingomyelin breakdown. **Cell**, v. 71, n. 5, p. 765–776, nov. 1992.
- SHIMADA, K. et al. Involvement of mannose receptor in glycopeptidolipid-mediated inhibition of phagosome-lysosome fusion. **Microbiology and immunology**, v. 50, n. 3, p. 243–51, 2006.
- SOUSA, L. M. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 1, p. 13–31, 2014.
- STAFEEV, I. et al. Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 33, n. 2, p. 148–159, fev. 2018.
- 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. 287–92, 1 jul. 1992.
- STRISSEL, K. J. et al. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 18, n. 10, p. 1918–25, out. 2010.
- SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. **Adipose tissue remodeling and obesity** **Journal of Clinical Investigation**, 2011. Disponível em: <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 5 dez. 2018
- SWIRSKI, F. K. et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 612–616, 31 jul. 2009.
- TACCHINI-COTTIER, F. et al. An Immunomodulatory Function for Neutrophils During the Induction of a CD4⁺ Th2 Response in BALB/c Mice Infected with Leishmania major; **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2628 LP-2636, 1 set. 2000.
- TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1407–1412, 5 set. 2012.
- TAMOUTOUNOUR, S. et al. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 925–938, 14 nov. 2013.
- TANOWITZ, H. B. et al. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 276–284, 29 nov. 2017.
- TORRES, L. et al. The Intriguing Relationship Between Obesity and Infection. **Journal of Infectiology**, v. 1, n. 1, p. 6–10, 2018.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.
- VAN GAAL, L. F.; MERTENS, I. L.; DE BLOCK, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875–880, dez. 2006.
- VERSIANI, A. et al. Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. v. 13, p. 1002–1005, 2011.
- VIEIRA, L. Q. et al. Infection with Leishmania major induces interleukin-12 production

- in vivo. **Immunology Letters**, v. 40, n. 2, p. 157–161, 1994.
- VIEIRA, L. Q. et al. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 827–835, 1996.
- VISHVANATH, L. et al. Pdgfr β + Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 350–359, 9 fev. 2016.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.
- WHO. **Obesity and Overweight**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- WHO TECHNICAL REPORT SERIES. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. **World Health Organization technical report series**, v. 949, n. March, p. 202, 2010.
- WIELAND, C. W. et al. Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. **International Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1399–1408, 1 nov. 2005.
- WILDMAN, R. P. et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). **Archives of internal medicine**, v. 168, n. 15, p. 1617–1624, ago. 2008.
- WILLIAMS, E. P. et al. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 3, p. 363–370, 28 set. 2015.
- WYSS, K. et al. Obesity and Diabetes as Risk Factors for Severe Plasmodium falciparum Malaria: Results From a Swedish Nationwide Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 6, p. 949–958, 15 set. 2017.
- YAN, J. et al. Obesity- and aging-induced excess of central transforming growth factor- β potentiates diabetic development via an RNA stress response. **Nature medicine**, v. 20, n. 9, 2014.
- ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425, 1 dez. 1994.

ANEXO

APROVAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 338 / 2012, relativo ao projeto intitulado "A obesidade induzida por dieta é capaz de alterar os mecanismos da leishmaniose em camundongos?", que tem como responsável tatiani uceli maioli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 01/10/2013. Este certificado espira-se em 01/10/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 338 / 2012, related to the Project entitled "Is there influence of diet induced obesity in mouse leishmaniosis?", under the supervision of tatiani uceli maioli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 01/10/2013. This certificate expires in 01/10/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 01/10/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br