

Camila Pereira de Queiroz

**Infecção helmíntica exerce efeito benéfico no  
desenvolvimento da obesidade experimental e suas  
consequências metabólicas**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, 2017

Camila Pereira de Queiroz

**Infecção helmíntica exerce efeito benéfico no desenvolvimento da obesidade experimental e suas consequências metabólicas**

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

**Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, 2017

Dedico este trabalho à minha *ohana*, Bárbara e Lucas, que reforçam a cada dia a concepção de nunca abandonar e nem esquecer.

## AGRADECIMENTOS

Então uma batalha chega ao fim... Uma batalha que representa na verdade um começo e não propriamente um fim. Imersa em um momento de sensações diversas, alegria, orgulho, tristeza e desespero, só me resta agradecer. Agradecer, e agradecer imensamente pois se há algo que aprendi nestes dois anos é que ninguém faz ciência sozinho.

Agradeço primeiramente a Deus, que por meio de todas as linhas tortas me permitiu e me deu forças para chegar até aqui.

Às agências financiadoras, CNPq e FAPEMIG, que permitiram a execução do projeto e também garantiram a minha bolsa de mestrado.

Ao professor Helton Santiago que me resgatou pelos corredores do ICB e me aceitou de braços abertos em seu time de pesquisadores. Professor, obrigada pelos apertos que você me fez passar e por toda a confiança depositada em meu trabalho, especialmente nesta etapa final. Você me ensinou, do seu jeito, a ser uma pessoa/pesquisadora melhor.

À professora Jacqueline Alvarez-Leite pelas contribuições essenciais para a finalização do trabalho.

Às técnicas Eneida Paganini e Maria Helena Alves que mantêm a ordem nos ambientes de trabalho, facilitando a vida de quem trabalha de forma adequada.

À Ester Roffê pelo carinho e pelos conselhos, principalmente na estruturação das apresentações.

À Fernanda Freire por todo carinho, atenção, confiança e paciência durante as inúmeras horas debruçadas sobre o Fortessa.

À Rachel Horta, que me ensinou praticamente tudo o que sei sobre experimentação animal e obesidade. Obrigada pela paciência, determinação e alegria em me ensinar. O trabalho só existe hoje, porque você ajudou a começar e me instruiu a continuar.

Ao Caio Freitas, meu eterno melhor companheiro de laboratório. Obrigada por ter me dado coragem de ir até a UFMG para conquistar o meu espaço. Agradeço também pela

companhia no início da execução do projeto, se você não estivesse lá não teria conseguido chegar até aqui. Senti e ainda sinto muito sua falta.

À Luciana Ventura, pela disponibilidade e paciência em me ensinar/ajudar. Lu, você foi uma das melhores pessoas que eu tive o prazer de conviver na UFMG. Trabalhar e conversar com você me ajudou a desabafar, colocar a cabeça no lugar e traçar novas metas. Admiro muito a pessoa e a pesquisadora que você é.

Às meninas do LABiN, que sempre me receberam com boa vontade e disposição.

Ao meu grupo de Bases, especialmente ao Allysson e a Camila, por me ajudarem a segurar a barra e sobreviver à experiência mais exaustiva de toda a minha vida.

Ao Team Mara: Angélica, Laila, Marcela, Michele e Sarah, minha família da UFMG. Muito obrigada por nunca me deixarem desistir, por me ajudarem a passar por esta reta final, por todas as risadas, lágrimas e cafés compartilhados em 2016. Vocês são Mara! Gostaria de agradecer especialmente a Marcela, por todo o carinho, confiança, desabafos, companheirismo, ensinamentos... Marcela nem sei eu tivesse a oportunidade de viver 100 vidas seria capaz de pagar tudo o que você já fez por mim. Criamos um laço em um momento que só existia você e eu, eu e você, e isto me deu a oportunidade de aprender a ser uma cientista melhor. Eu pude aprender com a sua perfeição. Você é o melhor presente que a UFMG me deu.

Aos meus pais, Izabel e Jadir, por nunca colocarem empecilhos na trajetória rumo aos meus sonhos e por terem criado uma pessoa dedicada e responsável. São estas características que sustentam a minha caminhada rumo ao sucesso profissional.

Às minhas amigas de PUC mais que maravilhosas, Bárbara, Bia e Carol. Por todos os momentos de convivência que me permitem fugir das preocupações do dia a dia. Obrigada pela compreensão em relação às ausências eternas e por terem tanto orgulho de mim. Agradeço especialmente a Bia, minha irmã de coração, que prova todos os dias que não importa o que eu precise, rir ou chorar, ela sempre estará lá. Agradeço também ao Fernando, que hoje me empresta a Bia sem pestanejar e que me dá o prazer da convivência geralmente em momentos que eu mais preciso de carinho. Além disso, Bia e Fe vocês são minha inspiração... todos os passos profissionais que eu dou, eu dou pensando em alcançar a minha versão da família linda que vocês têm.

À Bárbara minha irmã de sangue, que na verdade se tornou minha filha/amiga. Amor, você é a minha motivação principal em ser uma pessoa melhor e mais competente. Quero conseguir conquistar todos os meus sonhos para proporcionar a você a realização de todos os seus.

E finalmente.... A você Lu, meu principal apoio. Obrigada inicialmente por me ensinar a ser uma pessoa melhor, porque se eu não tivesse aprendido a ser um pouquinho como você eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada pelo companheirismo nos momentos de experimento aos sábados, domingos, feriados e madrugadas, você sabe o quanto isso é importante para mim. Obrigada principalmente por compartilhar sonhos comigo todos os dias... São eles que nunca me deixam desistir. Você é essencial para mim....

Enfim, agradeço de coração a todos que contribuíram um pouquinho para a realização deste trabalho. Um dia consigo retribuir toda a ajuda. E que venha o doutorado!

“Nunca se esqueça de quem é, porque é certo que o mundo não se esquecerá. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza”

George R. R. Martin

## RESUMO

Obesidade é uma doença inflamatória crônica de abrangência mundial, caracterizada pelo acúmulo anormal e excessivo de gordura que pode provocar danos à saúde. A grande preocupação acerca desta doença diz respeito aos distúrbios metabólicos associados a ela, que podem resultar em síndrome metabólica. A infecção por helmintos induz diversos mecanismos capazes de regular e modular a resposta imune do hospedeiro, garantindo a sua permanência. Estas modulações, que incluem a ativação de células T reguladoras, acabam sendo benéficas ao indivíduo, diminuindo a inflamação e consequentemente impedindo o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a influência da infecção por *Heligmosomoides polygyrus* no desenvolvimento de obesidade e suas consequências. Camundongos C57BL/6 machos, livres de patógenos específicos, foram submetidos à dieta controle ou indutora de obesidade, por até oito semanas, na presença ou não de infecção helmíntica. Semanalmente foram avaliados parâmetros de ganho de peso, ingestão calórica e manutenção da infecção, e posteriormente resistência à insulina, colesterol, secreção de adipocinas, inflamação e migração celular para tecido adiposo. Apesar de não haver diferença na ingestão calórica entre os animais submetidos à dieta hiperlipídica, a presença da infecção foi capaz de prevenir o ganho de peso, exercendo influência no peso do tecido adiposo, epididimal e subcutâneo. Este efeito não ocorre devido a espoliação do parasita já que não houve diferença de peso entre os grupos que receberam dieta controle. Além disso, a infecção foi capaz de impedir o desenvolvimento de: hipertrofia exacerbada dos adipócitos, resistência à insulina e desregulação na produção de adipocinas. Houve também diminuição da inflamação, aparentemente em mecanismo independente de IL-10, e aumento de células T reguladoras e eosinófilos no tecido adiposo. Apesar disso, a infecção não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, nem alterar a migração de células inflamatórias (Th17, ILC1, ILC3) para o tecido. No geral, a infecção foi capaz de prevenir o ganho exacerbado de peso e o desenvolvimento de consequências associadas à obesidade, provavelmente devido a diminuição da inflamação, associada ao aumento das células T reguladoras.

**Palavras-chave:** *Heligmosomoides polygyrus*, inflamação, imunorregulação



## ABSTRACT

Obesity is a worldwide disease defined by the excessive amount of fat that can cause damage to the health. The greatest concern about this disease is associated with the metabolic disorders developed with it, that can lead to metabolic syndrome. The helminth infection can induce various mechanisms capable of modulating and regulating the immune response of the host, ensuring their stay. These modulations, including the activation of T regulatory cells, end up being beneficial to the host, because it decreases the inflammation and impairs the development of inflammatory chronic diseases. Considering that, the present study aimed to verify the influence of the infection by *Heligmosomoides polygyrus* in the development of obesity and its consequences. Male C57BL/6, specific pathogen free, were fed a control diet or a high fat diet, for up to eight weeks, in the presence or not of the infection. Weight gain, caloric intake and egg counting in the stool were evaluated weekly. At the end of the experiment we also evaluated parameters related to insulin resistance, cholesterol, secretion of adipokines, inflammation and cellular migration to the adipose tissue. Despite no difference in the caloric intake between the animals fed with high fat diet, the infection was able to prevent the weight gain, also decreasing the weight of epididymal and subcutaneous fat. This effect does not occur due parasite spoliation because there was no difference between the groups that received control diet. Also, the infection prevented the development of adipocytes hypertrophy, insulin resistance and deregulation in the production of adipokines. The inflammation decreased, apparently in a manner independent of IL-10, and the percentage of T regulatory cells and eosinophils increased in the adipose tissue. Besides that, the infection was not able to reduce the oxidative stress, neither change the migration of inflammatory cells (Th17, ILC1, ILC3) to the adipose tissue. Overall, the infection prevented the exacerbated weight gain and the development of obesity associated consequences, probably by decreasing the inflammation, associated to the increase of T regulatory cells.

**Keywords:** *Heligmosomoides polygyrus*, inflammation, imunoregulation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Prevalência mundial da obesidade em mulheres acima de 18 anos no ano de 2014	20
<b>Figura 2:</b> Prevalência mundial da obesidade em homens acima de 18 anos no ano de 2014	20
<b>Figura 3:</b> Mecanismos regulatórios ativados pela presença de helmintos e potenciais alvos afetados por esta imunorregulação	28
<b>Figura 4:</b> Ciclo de vida do <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	30
<b>Figura 5:</b> Estratégia de <i>gate</i> painel Linfócitos B	49
<b>Figura 6:</b> Estratégia de <i>gate</i> painel Imunidade Inata	50
<b>Figura 7:</b> Estratégia de <i>gate</i> painel células T reguladoras	52
<b>Figura 8:</b> Estratégia de <i>gate</i> painel Células Linfoides Inatas	55
<b>Figura 9:</b> Estratégia de <i>gate</i> painel Linfócitos T	56
<b>Figura 10:</b> Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> atenua o ganho de peso em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica por oito semanas, apesar de não alterar o consumo calórico	59

<b>Figura 11:</b> Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> é mantida ao longo de todo período experimental	60
<b>Figura 12:</b> Infecção helmíntica previne o desenvolvimento de hipertrofia exacerbada em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica	61
<b>Figura 13:</b> Infecção helmíntica melhora a resistência à insulina e glicose em jejum em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica	63
<b>Figura 14:</b> Aumento dos níveis séricos de colesterol total e HDL em camundongos infectados submetidos à dieta hiperlipídica	64
<b>Figura 15:</b> Desregulação na produção de adipocinas nos animais não infectados submetidos à dieta hiperlipídica	65
<b>Figura 16:</b> Infecção helmíntica diminui a expressão de citocina inflamatória, sem alterar expressão de citocina anti-inflamatória em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica	66
<b>Figura 17:</b> Dieta hiperlipídica não altera mecanismos antioxidantes, apesar de aumentar o estresse oxidativo	67
<b>Figura 18:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de basófilos e células NKs para o tecido adiposo	70
<b>Figura 19:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de macrófagos e macrófagos M1 para o tecido adiposo	71
<b>Figura 20:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de células dendríticas para o tecido adiposo	72
<b>Figura 21:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de neutrófilos para o tecido adiposo	73

<b>Figura 22:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de linfócitos B para o tecido adiposo	74
<b>Figura 23:</b> Animais infectados <i>com Heligmosomoides polygyrus</i> apresentam maior porcentagem de eosinófilos no tecido adiposo, independente de serem submetidos ou não à dieta hiperlipídica	75
<b>Figura 24:</b> Dieta hiperlipídica aumenta a porcentagem de monócitos no tecido adiposo de animais não submetidos a infecção	76
<b>Figura 25:</b> Infecção helmíntica previne a redução no número de células T reguladoras no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica	77
<b>Figura 26:</b> Dieta hiperlipídica aumenta a migração de ILC1 para o tecido adiposo independente da infecção helmíntica	78
<b>Figura 27:</b> Infecção helmíntica previne o aumento do número de ILC2 no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica	79
<b>Figura 28:</b> População de ILC3 apresenta migração aumentada em todos os grupos de estudo quando comparados ao grupo não infectado submetido à dieta AIN-93M	80
<b>Figura 29:</b> Dieta hiperlipídica diminui a migração de células Th1 para o tecido adiposo de animais não submetidos a infecção helmíntica	81
<b>Figura 30:</b> Dieta hiperlipídica, associada ou não a uma infecção helmíntica, não altera a migração de células Th2 para o tecido adiposo	82
<b>Figura 31:</b> Dieta hiperlipídica aumenta a migração de células Th17 para o tecido adiposo independente da infecção helmíntica	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição energética (% do valor calórico total - VCT) das dietas AIN-93M e DIO	34
<b>Tabela 2:</b> Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR	41
<b>Tabela 3:</b> Anticorpos utilizados no painel de Linfócitos B e Imunidade Inata, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em $\mu\text{L}$ , para marcação de $1 \times 10^6$ células	48
<b>Tabela 4:</b> Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em $\mu\text{L}$ , para marcação de $1 \times 10^6$ células	51
<b>Tabela 5:</b> Anticorpos utilizados no painel de Células Linfoides Inatas e Linfócitos T, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em $\mu\text{L}$ , para marcação de $1 \times 10^6$ células	54
<b>Tabela 6:</b> Frequência de adipócitos (%), por grupo de estudo, de acordo com a área dos mesmos	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> – Quimiocina ligante
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> – Grupo de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG
cm	Centímetros
Ct	<i>Threshold cycle</i> – Ciclo de limiar
DIO	Dieta Indutora de Obesidade
dL	Decilitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de absorção imunoenzimático
Eut Ct	Grupo Eutrófico Controle
Eut Inf	Grupo Eutrófico Infectado
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN	Interferon
IKK	<i>Inhibitory kappa Kinase</i> - Inibidor de Quinase Kapa

ILC	<i>Innate Lymphoid Cells</i> - Células Linfoides Inatas
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i> - Substrato de Receptor de Insulina
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> – Quinase cJun N terminal
kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> - Lipoproteínas de Baixa Densidade
m	Metros
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
N	Normalidade
ng	Nanograma
NK	Células <i>Natural killer</i> – células assassinas naturais
nm	Nanômetro
Ob Ct	Grupo Obeso Controle
Ob Inf	Grupo Obeso Infectado

PBS	Tampão fosfato salino
qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Tecido Adiposo Epididimal
TAM	Tecido Adiposo Mesentérico
TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator de transformação de crescimento
Th	<i>T helper</i> – T auxiliar
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptores do tipo <i>Toll</i>
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSI	Teste de Sensibilidade à Insulina
TTOG	Teste de Tolerância Oral a Glicose
U	Unidades
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCT	Valor Calórico Total
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i> Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade



$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1	Animais e dietas .....	33
3.2	Desenho experimental.....	34
3.3	Análise histológica do tecido adiposo.....	35
3.4	Teste de Sensibilidade à Insulina.....	35
3.5	Teste de Tolerância Oral a Glicose.....	36
3.6	Avaliação do perfil lipídico e glicemia.....	36
3.7	Análise da expressão gênica .....	38
3.8	Isolamento adipócitos e células estromais .....	41
3.9	Cultura de adipócitos .....	42
3.10	ELISA para Adiponectina.....	42
3.11	Análise de estresse oxidativo .....	43
3.12	Citometria de Fluxo .....	46
3.13	Análise estatística.....	57
3.14	Questões éticas.....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
4.1	Infecção helmíntica previne o ganho exarcebado de peso em animais submetidos à dieta hiperlipídica, apesar de manter inalterado o consumo calórico .....	58
4.2	Infecção helmíntica previne o aumento exacerbado na área dos adipócitos de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica .....	60
4.3	Infecção helmíntica melhora parâmetros relacionados a síndrome metabólica.....	62
4.4	Infecção helmíntica impede a desregulação da produção de adipocinas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica .....	64

4.5	Infecção helmíntica diminui a inflamação no tecido adiposo de maneira, aparentemente, independente a produção de IL-10 .....	65
4.6	Dieta hiperlipídica mantém inalterados mecanismos antioxidantes apesar de aumentar o estresse oxidativo .....	66
4.7	Infecção helmíntica aumenta a migração de células reguladoras para o tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica, apesar de manter inalterada a migração de células inflamatórias para o mesmo local .....	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

# 1 INTRODUÇÃO

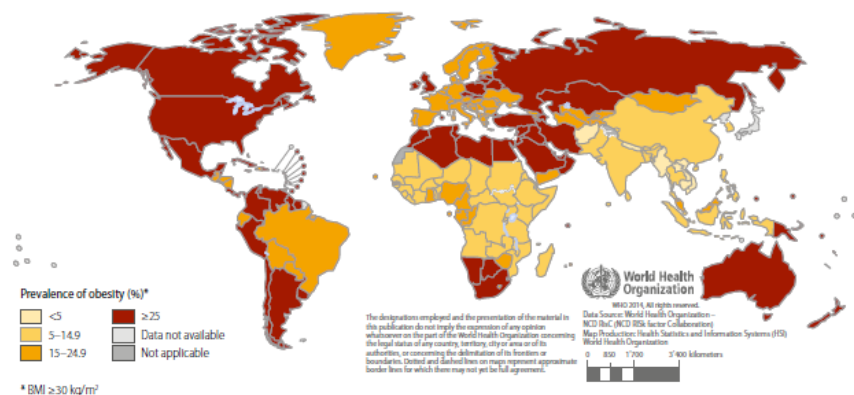
Sobrepeso e obesidade são importantes problemas de saúde mundial, definidos como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode provocar danos à saúde (WHO, 2016). Este acúmulo de gordura é possibilitado pelos adipócitos que ao receberem mais energia do que precisam armazenar, tendem a se alterar gradativamente, crescendo em número (hipertrofia) e tamanho (hiperplasia), para conseguirem estocar esta energia excedente (Jo et al., 2009).

A determinação de sobrepeso e obesidade pode ser realizada de diversas formas, sendo que as mais simples e práticas incluem o cálculo do índice de massa corporal (IMC) e a medida da circunferência da cintura. O IMC é calculado a partir da divisão do peso (Kg) pela altura ao quadrado ( $m^2$ ), que quando resulta em valores entre: 19 e 24 indica o peso normal, 25 e 29 indica sobrepeso, e a partir de 30 indica obesidade (WHO, 2000). Já os valores relacionados a medida da circunferência da cintura (cm) variam entre homens e mulheres, sendo que, medidas menores que 95 e 80 demonstram o peso normal para os respectivos gêneros, entre 95 - 102 e 80 - 88, são consideradas sobrepeso, e valores acima deste parâmetro considerados obesidade (Lean, 1998).

A prevalência da obesidade vem aumentando de forma significativa com o passar dos anos, sendo que seus índices mais que dobraram entre 1980 e 2014 (WHO, 2016). Na década de 80, quando se iniciou a preocupação em relação a esta doença, a grande maioria dos casos ocorria nos países desenvolvidos. Hoje, a obesidade é amplamente distribuída pelo mundo, com maior taxa de crescimento nos países em desenvolvimento, que abrigam 62% da população obesa mundial (Ng et al., 2014). Este aumento da obesidade resultou na estimativa, de que em 2014, aproximadamente dois bilhões de adultos estavam com problemas de sobrepeso, sendo que 600 milhões destes apresentavam obesidade (WHO, 2016). Especificamente no Brasil, 82 milhões de adultos se enquadram nas categorias de sobrepeso e obesidade, o que corresponde a cerca de 60% da população adulta do país (Brasil, 2015). Nas figuras 1 e 2 é possível observar a prevalência mundial da obesidade em adultos, e o fato de que ela afeta mais a população feminina (Figura 1) do que a masculina (Figura 2). Além da alta ocorrência de sobrepeso e obesidade em adultos, o índice destes

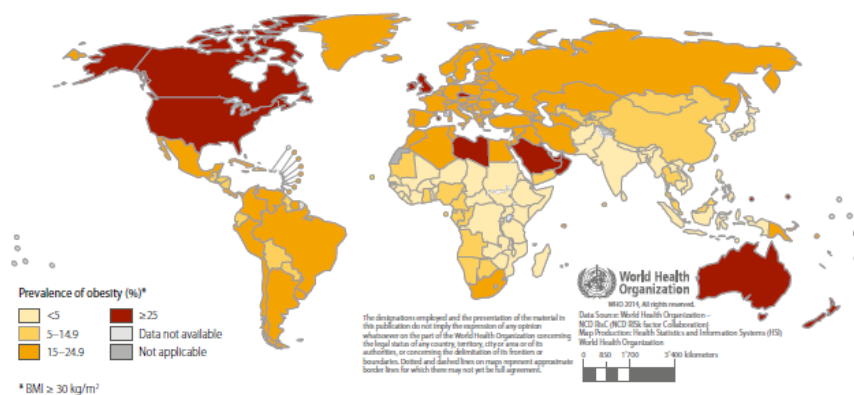
distúrbios tem aumentado cada vez mais em crianças, sendo que em 2014, cerca de 41 milhões de crianças com idade menor que cinco anos se encaixavam em uma destas categorias (WHO, 2016).

Fig. 7.2 Age-standardized prevalence of obesity in women aged 18 years and over (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), 2014



**Figura 1: Prevalência mundial da obesidade em mulheres acima de 18 anos no ano de 2014.** A taxa de prevalência da obesidade é indicada pela intensidade das cores, sendo que cores mais fortes (vermelho) indicam maiores índices e cores mais brandas (amarelo claro) demonstram menores ocorrências. Fonte: WHO, Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014, p.80

Fig. 7.1 Age-standardized prevalence of obesity in men aged 18 years and over (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), 2014



**Figura 2: Prevalência mundial da obesidade em homens acima de 18 anos no ano de 2014.** A taxa de prevalência da obesidade é indicada pela intensidade das cores, sendo que cores mais fortes (vermelho) indicam maiores índices e cores mais brandas (amarelo claro) demonstram menores ocorrências. Fonte: WHO, Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014, p.80

Este aumento expressivo na prevalência da obesidade está relacionado com mudanças no estilo de vida da sociedade, que hoje opta pelo consumo elevado de alimentos ricos em gorduras e abandona cada vez mais a prática de atividade física (Grundy, 2004). No Brasil, por exemplo, cerca de 20% da população consome doces e refrigerantes regularmente e quase 16% não pratica nenhum tipo de atividade física, nem mesmo no deslocamento para o trabalho (VIGITEL Brasil, 2015). Estas práticas acabam gerando um desequilíbrio entre calorias consumidas e gastas, o que corresponde justamente a principal causa para o desenvolvimento da obesidade. Outros fatores como predisposição genética, problemas hormonais, uso de determinados tipos de medicamentos e desregulações emocionais, como depressão, também podem ser considerados predisposições para o desenvolvimento deste distúrbio (NIH, 2012).

Esta alta prevalência da obesidade gera impactos para a economia, visto que há custos diretos, com médicos e hospitais, e indiretos, devido a perda de produtividade por parte do indivíduo obeso (Bahia & Araújo, 2014). Nos Estados Unidos, por exemplo, o gasto anual relacionado a obesidade excede 215 bilhões de dólares, sendo 147 bilhões associados a médicos e medicamentos e 66 bilhões relacionados a perda de produtividade (Hammond & Levine, 2010). Em relação ao tratamento de doenças relacionadas à obesidade, no Brasil, por exemplo, são gastos dois bilhões de dólares anualmente, sendo 1,4 bilhões destinados apenas a hospitalizações (Bahia et al., 2012).

Além disso, a grande preocupação acerca do alto índice de obesidade ocorre devido ao fato da associação deste distúrbio com o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas como: aumento de pressão arterial, resistência à insulina, diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL), e aumento dos níveis séricos de: triglicerídeos, glicose em jejum e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Grundy, 2004). No indivíduo obeso estas alterações, geralmente, ocorrem em conjunto e não de forma isolada, o que resulta na síndrome metabólica (Grundy, 1999). Com a persistência do excesso de peso ao longo tempo, estas alterações metabólicas também permanecem, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de consequências mais graves como: diabetes tipo II (Mokdad et al., 2003), hipertensão (Redon, 2001), esteatose hepática (Fabbrini et al., 2010), cardiopatia isquêmica (Wong & Marwick, 2007) e até determinados tipos de câncer

(fígado, endométrio, mama, ovário, próstata, rim, cólon, bexiga) (Larsson & Wolk, 2007a; Fader et al., 2009; Stephenson & Rose, 2009; Olsen et al., 2007; Freedland & Platz, 2007; Pan et al., 2006; Frezza et al., 2006; Larsson & Wolk, 2007b). Como resultado disso, hoje estes distúrbios de peso são considerados o quinquagésimo no ranking de fatores de risco de morte global, tendo pelo menos 2,8 milhões de adultos como vítimas por ano (EASO, 2013).

Diante da gravidade destes distúrbios associados à obesidade, pesquisas focadas principalmente no tecido adiposo foram realizadas com o intuito de compreender os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dos mesmos. A partir dos resultados encontrados, principalmente desde o descobrimento da produção, pelo tecido adiposo, de uma molécula reguladora da saciedade, hoje chamada de leptina, o tecido adiposo deixou de ser visto apenas como um reservatório de gordura e passou a ser compreendido como um importante órgão endócrino (Zhang et al., 1994; Flier, 1995; Kershaw & Flier, 2004). Além da leptina, as descobertas mostraram que o tecido adiposo é capaz de produzir diversas outras substâncias que têm ação local e sistêmica, permitindo inclusive a comunicação deste tecido com outros órgãos do corpo (Kershaw & Flier, 2004). Estas substâncias, que incluem os hormônios: adiponectina, leptina, resistina e visfatina, foram denominadas adipocinas e são capazes de exercer funções variadas inclusive neuroendócrinas, relacionadas ao metabolismo de energia e imunidade, sendo essenciais para a manutenção da homeostase metabólica (Kershaw & Flier, 2004; Cao, 2014). Devido a importância metabólica destas substâncias, hoje é bem estabelecido que a desregulação na secreção das mesmas corresponde a uma das principais causas responsáveis pelo desenvolvimento das desordens metabólicas associadas à obesidade (Zou & Shao, 2008; Rasouli & Kern, 2008; Cao, 2014).

A leptina é considerada uma das principais substâncias relacionadas a regulação metabólica, pois é capaz de regular o peso corporal e a deposição de gordura através da indicação de saciedade (Pellemounter et al., 1995). A leptina produzida pelo tecido sinaliza o estado nutricional do organismo para o sistema nervoso central, principalmente para o hipotálamo, que como resposta, produz neuropéptídeos e neurotransmissores que modulam a ingestão de comida e o gasto de energia (Campfield et al., 1995; Cao, 2014). Na

obesidade há um aumento excessivo na produção deste hormônio, já que sua quantidade é proporcional a quantidade de tecido adiposo (Zou & Shao, 2008). No entanto não há uma diminuição de apetite por parte dos indivíduos obesos, o que ocorre na verdade é o desenvolvimento de uma resistência à leptina, que leva inclusive a alterações no ganho de peso (Halaas et al., 1997; Frederich et al., 1995; Shapiro et al., 2008).

Além de regular a saciedade, a leptina exerce um papel importante no metabolismo de glicose, atuando em diferentes pontos da cascata de sinalização da insulina, como nos substratos de receptor de insulina 1 e 2 (IRS 1 e 2), na proteína quinase ativada por mitógeno e na fosfatidilinositol 3 quinase (Szanto & Kahn, 2000). Devido a esta associação entre leptina e insulina, estudos comprovam que a desregulação na produção de leptina, devido ao excesso de nutrientes, está associada ao desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo II (Wang et al., 2001; Zou & Shao, 2008).

A adiponectina corresponde a outra adipocina importante no metabolismo da glicose, agindo principalmente no músculo esquelético e fígado, tendo como principal ação potencializar o efeito da insulina (Chandran et al., 2003; Berg et al., 2001). No músculo é responsável por aumentar a fosforilação em tirosina do receptor de insulina, o que acarreta em aumento na sensibilidade a este hormônio. No fígado, é capaz de diminuir o influxo de ácidos graxos livres e aumentar a oxidação dos mesmos, ocasionando em menor deposição de glicose hepática e síntese de triglicerídeos, aumentando também a sensibilidade à insulina. Age também no endotélio vascular exercendo uma função diferenciada, pois atua principalmente na diminuição da adesão de monócitos no local, impedindo a inflamação vascular (Chandran et al., 2003). É encontrada em abundância no plasma de pessoas saudáveis (entre 1,9 e 17 mg/mL), e suas elevadas concentrações indicam uma relação inversa com diversas alterações morfológicas e metabólicas como: circunferência da cintura, quantidade de gordura visceral, nível de triglicerídeos, glicose em jejum e insulina, e também com o desenvolvimento de diabetes tipo II (Arita et al., 1999, Ryo et al., 2004; Li et al., 2009). Além disso, o nível de colesterol HDL parece estar diretamente relacionado com a quantidade de adiponectina (Ryo et al., 2004).

Na obesidade há desenvolvimento de estresse oxidativo e inflamação, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias, que parecem atuar nos adipócitos



impedindo a transcrição de adiponectina e conseqüentemente diminuindo sua concentração no plasma, que permanece entre 0,5 e 6,9 mg/mL (Furukawa et al., 2004; Maeda et al., 2002; Arita et al., 1999). Esta redução tem como consequência o desenvolvimento de alterações metabólicas, como aumento dos níveis séricos de glicose, triglicérides e insulina, podendo acarretar inclusive no desenvolvimento de sensibilidade à insulina, diabetes tipo II e esteatose hepática (Ryo et al., 2004; Li et al., 2009).

Não só adipocinas, mas também citocinas anti e pró-inflamatórias provenientes de células imunes residentes no tecido estão relacionadas com o desenvolvimento ou não das conseqüências associadas à obesidade (Lumeng et al., 2007a; Hotamisligil et al., 1995). Nos indivíduos magros há predominância de citocinas do tipo 2 e regulatórias (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10) que são responsáveis pela ativação alternativa dos macrófagos, macrófagos M2, residentes no próprio tecido adiposo (Patel et al., 2013). Tais citocinas são produzidas por células Th2, células T reguladoras (Treg), eosinófilos e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) sendo capazes de alterar o estado inflamatório e metabólico do próprio tecido adiposo (Tiemessen et al., 2007; Wu et al., 2011; Molofsky et al., 2013). A polarização de macrófagos M2 é de suma importância para o metabolismo, pois estas células são responsáveis pela secreção de diversas citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que auxiliam na manutenção da sensibilidade à insulina (Lumeng et al., 2007a; Patel et al., 2013). Já nos indivíduos obesos há uma predominância de células Th1 e ILC1, que através de citocinas, como interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), estimulam a polarização de macrófagos M1, ou classicamente ativados (Lumeng et al., 2007b; O'Sullivan et al., 2016). Estas células são pró-inflamatórias e secretam citocinas, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$ , que auxiliam no desenvolvimento da inflamação associada a obesidade e também das suas demais conseqüências, como desenvolvimento de diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e esteatose hepática (Patel et al., 2013).

Além da estimulação de macrófagos M1, diversos outros mecanismos auxiliam no desenvolvimento e estabelecimento da inflamação no tecido durante a obesidade (Gregor & Hotamisligil, 2011). Um deles corresponde a ativação das cascatas de sinalização de c Jun N terminal quinase (JNK) e inibidor de quinase kapa (IKK), que são ativadas por alterações metabólicas (acúmulo de glicose e lipídeos, desenvolvimento de estresse no retículo,

aumento de ácidos graxos livres e de citocinas pró-inflamatórias), e levam ao aumento na transcrição de genes inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL2) e também à fosforilação em serina do IRS-1, que atenua a ação da insulina (Ozcan et al., 2004; Solinas & Karin, 2010). Há também ativação de inflamassomas (induzem a secreção IL-1 $\beta$ ) e receptores do tipo Toll (TLR), como o TLR4, que estão associados ao desenvolvimento de diabetes tipo II e estresse metabólico (Schroder et al., 2010, Song et al., 2006).

A inflamação estabelecida por estes mecanismos persiste ao longo do tempo, e acaba por induzir a migração de diversas células imunes para o tecido adiposo, alterando a composição da fração estromal (células que não são adipócitos) (Gregor & Hotamisligil, 2011). Dentre estas células migratórias é possível citar os mastócitos e as células *natural killers* (NKs) que contribuem para apoptose dos adipócitos e para desregulações no metabolismo de glicose (Liu et al., 2009; Ohmura et al., 2010). Há também aumento de linfócitos B, que secretam citocinas pró-inflamatórias e produzem anticorpos patogênicos que contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina (Winer et al., 2014). Em relação aos linfócitos T, além da predominância de células Th1, há aumento de células CD8<sup>+</sup> e diminuição da população de células T reguladoras (Nishimura et al., 2009; Feuerer et al., 2009). O aumento de CD8<sup>+</sup> auxilia na ativação e recrutamento de mais macrófagos para o tecido, sendo essencial para o estabelecimento da inflamação (Nishimura et al., 2009). Já a diminuição de células T reguladoras parece estar associada com o desenvolvimento de síndrome metabólica, visto que em indivíduos obesos que não desenvolvem esta síndrome há aumento de células FoxP3<sup>+</sup> (Pereira et al., 2014). Além disso, a diminuição da população de Treg demonstra a deficiência nos mecanismos de regulação que acabam falhando em diminuir a inflamação, que é mantida e reforçada por cada um dos mecanismos que a gera (Feuerer et al., 2009). Em resumo, na obesidade é gerada uma inflamação crônica que exerce papel fundamental no desenvolvimento das consequências associadas a ela (Xu et al., 2003).

Como mencionando anteriormente, outro distúrbio desenvolvido na obesidade, como consequência do estabelecimento da inflamação, corresponde ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, gerando estresse oxidativo (Marseglia et al., 2015). ROS são produtos gerados durante processos metabólicos naturais da célula, como na oxidação de

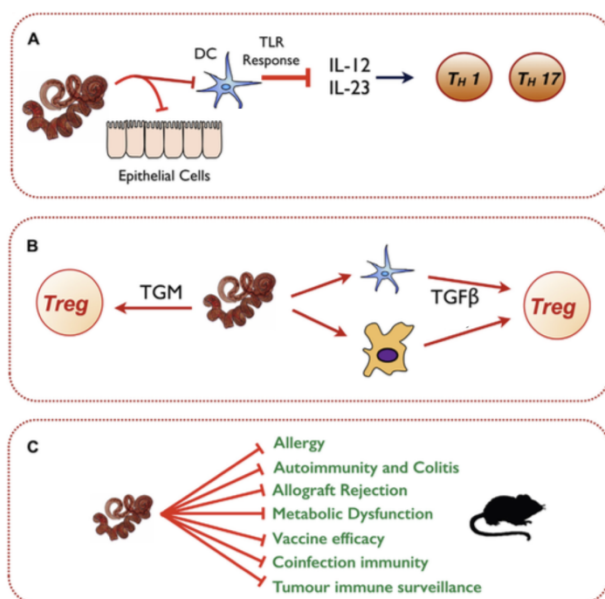
glicose, sendo os mais comuns o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Bondia-Pons et al., 2012). Como estas substâncias são altamente reativas e podem gerar danos celulares, existem diversos mecanismos antioxidantes, como a ação das enzimas superóxido dismutase e catalase, que são responsáveis por neutralizar as mesmas (McCord & Fridovich, 1969; Aebi, 1984). Na obesidade há um aumento na produção de ROS, pois correspondem a um dos subprodutos gerados pela ação de diversas células imunes ativadas, como macrófagos (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Além disso, as próprias citocinas pró-inflamatórias induzem a produção de ROS, como no caso de TNF- $\alpha$  que ativa sinais de transdução de fatores associados a produção destas substâncias (Chandel et al., 2001). Este aumento excessivo na produção de ROS gera um desbalanço entre estas substâncias e os mecanismos antioxidantes, o que corresponde ao estresse oxidativo (Vincent & Taylor, 2006; Valdecantos et al., 2009). Como consequência deste desbalanço é possível destacar o desenvolvimento de adiposidade, resistência à insulina e síndrome metabólica (Meigs et al., 2007; Furukawa et al., 2004). Além disso a própria geração de ROS leva a aumento na inflamação, gerando um ciclo vicioso entre estes dois parâmetros, aumentando ainda mais a probabilidade de desenvolvimento de consequências metabólicas danosas ao organismo obeso (Marseglia et al., 2015).

Diante da gravidade das consequências desenvolvidas na obesidade devido ao estabelecimento da inflamação, acredita-se que mecanismos capazes de conter a mesma sejam uma alternativa viável para impedir o desenvolvimento da obesidade, e consequentemente das desordens metabólicas associadas a este distúrbio (Gregor & Hotamisligil, 2011). Neste contexto diversos estudos têm demonstrado o efeito anti-inflamatório da presença de helmintos em hospedeiros submetidos a situações de doenças inflamatórias crônicas, como asma, esclerose múltipla e colite (Layland et al., 2013; Correale et al., 2008; Smith et al., 2007). Mas por quê helmintos? A infecção por estes parasitas é descrita para humanos desde os primórdios da história, sendo encontrados inclusive registros de ovos de helmintos em fezes de humanos mumificados datados de milhões de anos (Cox, 2002). Hoje, apesar de existirem intensivos tratamentos com o intuito de reduzir drasticamente a presença de helmintos na população humana, cerca de 30% da população mundial ainda apresenta infecção por algum destes parasitas (Hotez et al., 2008; McSorley & Maizels, 2012). Esta alta prevalência da infecção helmíntica em

humanos, é resultado de uma co-evolução do parasita e do sistema imune do hospedeiro, sendo a maioria dos casos de infecção por helmintos, assintomáticos (Bordes & Morand, 2009; McSorley & Maizels, 2012). Com o passar dos anos a resposta imune dos humanos evoluiu com a presença dos helmintos desenvolvendo mecanismos capazes de limitar a patologia dos helmintos, permitindo a permanência dos mesmos no hospedeiro e impedindo danos colaterais provocados pelos parasitas (Allen & Maizels, 2011). Da mesma maneira, os helmintos evoluíram diferentes métodos de co-existir com o hospedeiro ativando respostas regulatórias que garantem a sua permanência (Girgis et al., 2013; McSorley & Maizels, 2012). Dentre os mecanismos que exercem tal função, é possível destacar a ativação de células T e B reguladoras que garantem a não ativação de mecanismos pró-inflamatórios, prevenindo inclusive o desenvolvimento de patologia (Metenou & Nutman, 2013; Hussaarts et al., 2011). Além disso, há secreção de citocinas reguladoras, como IL-10 e fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sendo que a primeira atua inclusive na indução da produção de IgG4 que tem fenótipo não inflamatório, e a segunda estimula a diferenciação de Tregs (Satoguina et al., 2005; Zacone et al., 2009). Células dendríticas também são essenciais para esta regulação, porém exercem diferentes papéis, sendo que quando a sinalização de seus TLRs é bloqueada há impedimento da ativação de células Th1 e Th17, características de pacientes sintomáticos (Maizels & McSorley, 2016; Babu et al., 2009). Em outras situações estas células são responsáveis por estimular a diferenciação de células Th2 e Tregs, presentes predominantemente em indivíduos assintomáticos (Everts et al., 2010; Maizels & McSorley, 2016). Há também ativação de macrófagos M2 que inibem a proliferação de células Th1 e estimulam a diferenciação de células Tregs (Martinez et al., 2009; Maizels & McSorley, 2016). Estes mecanismos gerados pela presença dos helmintos com o intuito de garantir a permanência dos mesmos no hospedeiro, geram um ambiente regulatório que acaba exercendo papel fundamental no controle da inflamação em situações de doenças inflamatórias crônicas, autoimunidade e reação a transplantes (Maizels & McSorley, 2016). Na figura 3 estão exemplificados alguns destes mecanismos regulatórios e potenciais alvos dos mesmos.

Este ambiente regulador desenvolvido pela presença de helmintos foi comprovado por trazer benefícios ao hospedeiro em modelos de inflamação das vias aéreas (asma) (Layland et al., 2013), alergias alimentares (Bashir et al., 2002) e colite (Smith et al., 2007), sendo

que em todos eles a presença do parasita foi capaz evitar a inflamação e conseqüentemente impedir o desenvolvimento da doença. Estudos realizados com humanos também comprovam que a presença de helmintos diminui a probabilidade de desenvolvimento de alergias (Wilson & Maizels, 2004), esclerose múltipla (Correale et al., 2008), doenças autoimunes (Greenwood & Cantab, 1968) e inclusive impede o desenvolvimento de inflamação na presença de infecção por outro parasita (*Plasmodium*) (Dolo et al., 2012).



**Figura 3: Mecanismos regulatórios ativados pela presença de helmintos e potenciais alvos afetados por esta imunoregulação.** **A.** Helmintos impedem a sinalização de TLR das células dendríticas, que falham em ativar células Th1 e Th17. **B.** Helmintos estimulam a diferenciação de células Tregs de forma direta pela produção de miméticos de TGF- $\beta$  (TGM), ou pela produção de TGF- $\beta$  por macrófagos e células dendríticas. **C.** Potenciais alvos dos mecanismos de imunoregulação exercidos pelos helmintos. Fonte: Maizels & McSorley, 2016 (adaptado)

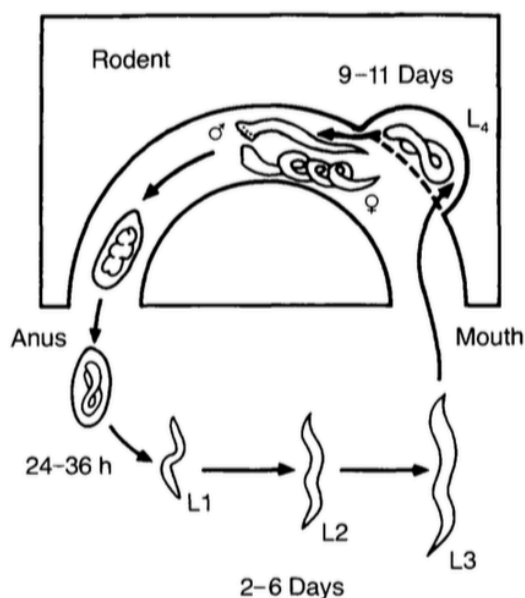
Além destes modelos de doenças alguns estudos envolvendo infecção helmíntica, obesidade e síndrome metabólica comprovam que a presença do parasita diminui: o ganho de peso, o peso do tecido adiposo visceral, o nível sérico de: glicose, triglicerídeos e colesterol; melhora a sensibilidade à insulina e a tolerância a glicose, e impede o desenvolvimento de esteatose hepática e diabetes tipo II (La Flamme et al., 2007; Stanley et al., 2009; Aravindhan et al., 2010; Chen et al., 2013; Wiria et al., 2013; Yang et al., 2013). Apesar de demonstrar estes efeitos benéficos da presença do parasita no desenvolvimento de obesidade e suas conseqüências, ainda há controvérsias em relação aos mecanismos imunológicos que geram estas melhorias, sendo que alguns estudos demonstram o aumento de células Th2 e macrófagos M2, sem alterar as células Th1 e outros apontam aumento de eosinófilos e diminuição de macrófagos (La Flamme et al., 2007; Yang et al., 2013; Wu et al., 2011).

Além disso, os modelos de infecção utilizados por estes estudos correspondem basicamente aos helmintos *Nippostrongylus brasiliensis* e *Schistosoma mansoni*, que devido a características associadas ao ciclo de vida e resposta imunológica induzida não correspondem a modelos ideais para estudos de regulação inflamatória na obesidade (Yang et al., 2013; Stanley et al., 2009; Doenhoff et al., 2002; La Flamme et al., 2007). No caso de *Nippostrongylus brasiliensis*, além de seu ciclo não ser exclusivo do intestino, passa primeiro pelos pulmões, ele tem duração curta, de apenas duas semanas, o que resulta na necessidade de diversas re-infecções durante estudos de obesidade, que duram geralmente oito semanas (Camberis et al., 2003). Estas re-infecções além de alterar constantemente a carga parasitária no hospedeiro, interferem na resposta imunológica que é variável de acordo com a carga do parasita e com a recorrência do mesmo. Considerando *Schistosoma mansoni*, além de seu ciclo não ocorrer exclusivamente no intestino (passa pela circulação e fígado), a infecção pode ocorrer de forma intensa, gerando sintomas nos modelos experimentais (anemia, perda de peso, diarreia sanguinolenta), podendo acarretar inclusive em exclusões de animais sintomáticos, exigindo assim observações diárias de saúde (Doenhoff et al., 2002).

Diante disso, um parasita que gera uma infecção subclínica e crônica, representa uma alternativa mais eficiente e natural para estudos de regulação helmíntica e obesidade (Camberis et al., 2003). Estas características correspondem a infecção por *Heligmosomoides polygyrus*, um parasita gastrointestinal murino capaz de regular a imunidade protetora do hospedeiro, garantindo sua permanência por longos períodos (até oito meses) (Monroy & Enriquez, 1992). A larva se alimenta de tecido do próprio hospedeiro e não de ingesta ou sangue, causando morbidades apenas quando se encontra em elevadas concentrações no intestino (Bansemir & Sukdeo, 1994). A susceptibilidade a infecção varia com sexo e idade, sendo machos jovens os hospedeiros mais susceptíveis (Dobson & Owen, 1978).

A larva de *Heligmosomoides polygyrus* passa por diferentes estágios de maturação, fora e dentro do hospedeiro até atingir a fase adulta que é produtora de ovos (Ehrenfor, 1954; Lawrence, 1990; Monroy e Enriquez, 1992). Os estágios iniciais da larva, L1 e L2, possuem tamanho variável entre 300 e 600  $\mu\text{m}$ , e são caracterizados pela presença de três

dentos córneos rudimentares visíveis no orifício da boca e também pela incapacidade de locomoção (Ehrenfor, 1954). Dentre 2 a 6 dias a larva atinge sua forma infectante, L3, que possui mobilidade, e tamanho entre 480 e 560  $\mu\text{m}$  (Ehrenfor, 1954; Lawrence, 1990; Monroy e Enriquez, 1992). A infecção ocorre por meio da ingestão destas larvas que migram diretamente para o lúmen do intestino aonde permanecem aderidos ao tecido (Ehrenfor, 1954; Lawrence, 1990; Monroy e Enriquez, 1992). No intestino, perdem o revestimento protetor e passam a ter tamanho entre 380 e 540  $\mu\text{m}$  (L4). Por fim, a forma adulta adquire formato espiral, com dimorfismo sexual de tamanho, sendo que: machos possuem de 8 a 10 mm e fêmeas de 18 a 21 mm (Ehrenfor, 1954). Cerca de 10 dias após a infecção os vermes adultos iniciam a produção de ovos que são eliminados pelas fezes do hospedeiro (Ehrenfor, 1954; Lawrence, 1990; Monroy e Enriquez, 1992). Os ovos depositados no meio eclodem de 24 a 36 horas após a deposição, preferencialmente em locais com temperatura entre 23 e 28°C, originando as larvas em estágio L1, iniciando o ciclo novamente (Ehrenfor, 1954) (Figura 4).



**Figura 4: Ciclo de vida do *Heligmosomoides polygyrus*.** A infecção ocorre por meio de ingestão de larvas em estágio, L3, que migram para o lúmen do intestino aonde permanecem aderidos. Após 9 a 11 dias de infecção, se inicia a produção de ovos, que são eliminados nas fezes. Fora do hospedeiro o ovo eclode, se tornando larva (L1) e amadurece até L3 para conseguir infectar um novo hospedeiro. Fonte: Monroy e Enriquez, 1992

A infecção por *H. polygyrus* induz no hospedeiro uma resposta imune associada ao aumento de eosinófilos, neutrófilos e ativação de macrófagos, porém também é capaz de induzir diversas outras respostas reguladoras reduzindo o efeito da resposta de expulsão

(Price, 1990; Penttila et al., 1984; Maizels et al., 2012). Dentre as respostas reguladoras é possível citar: a indução de células Tregs, alterações de fenótipos de macrófagos (M1 para M2) e indução de células dendríticas reguladoras (Maizels et al., 2012). Este modelo de infecção já foi utilizado por estudos envolvendo outras doenças inflamatórias, como asma e colite, suprimindo as mesmas através de mecanismos variados como: aumento de células Tregs associado ao aumento de expressão de TGF- $\beta$  e IL-10, bloqueio de produção de células Th1 associado ao aumento de IL-13, e também de forma independente de linfócitos T e B, utilizando apenas modulações das células dendríticas, sendo um modelo válido para estudos de regulação de doenças inflamatórias (Wilson et al., 2005; Elliott et al., 2004; Sutton et al., 2008; Hang et al., 2010).

Sendo assim, o intuito deste estudo foi verificar a influência da infecção por *Heligmosomoides polygyrus* não só no desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, mas também nas consequências associadas a ela (síndrome metabólica, desregulação de adipocinas e estresse oxidativo).



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência da infecção por *Heligmosomoides polygyrus* no desenvolvimento de obesidade experimental e da síndrome metabólica induzida por dieta hipercalórica e hiperlipídica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da infecção, por *H. polygyrus*, sobre:

- O ganho de peso e o consumo alimentar;
- O peso dos tecidos adiposo epididimal e subcutâneo;
- Desenvolvimento de hipertrofia no tecido adiposo epididimal;
- Os parâmetros associados a síndrome metabólica;
- Produção de adipocinas relacionadas à obesidade;
- O estabelecimento de inflamação no tecido adiposo epididimal;
- Desenvolvimento de estresse oxidativo no tecido adiposo mesentérico;
- O infiltrado celular do tecido adiposo.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e dietas**

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, livre de patógenos específicos, com idade inicial de quatro semanas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e mantidos no Biotério Experimental Ênio Cardillo Vieira, do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN), da mesma universidade. No Biotério Experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com no máximo cinco indivíduos por gaiola tendo água e dieta ofertados livremente. As condições ambientais foram controladas, sendo ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura em torno de 28°C.

Os camundongos receberam diferentes dietas, AIN-93M ou Dieta Indutora de Obesidade (DIO), por até oito semanas. A dieta AIN-93M é composta de BHT (0,0008%), cistina (0,18%), bitartarato de colina (0,25%), mix de vitaminas (1%), mix de minerais (3,5%), óleo de soja (4%), celulose (5%), sacarose (10%), caseína (14%), maltodextrina (15,5%) e amido de milho (46,5%), sendo caracterizada por possuir quantidades ideais e de acordo com a necessidade dos animais, de carboidratos, proteínas e lipídeos (Tabela 1). Já a DIO é composta de BHT (0,0014%), bitartarato de colina (0,25%), cistina (0,3%), mix de vitaminas (1%), mix de minerais (3,5%), celulose (5%), amido de milho (6,2%), caseína (20%), groselha (31%) e banha de porco (35,5%), sendo uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, contendo cerca de 62% do valor calórico total na forma de gordura saturada (Tabela 1) (Akagiri et al., 2008).

**Tabela 1:** Distribuição energética (% do valor calórico total - VCT) das dietas AIN-93M e DIO

	<b>Dieta AIN-93M</b>	<b>Dieta Indutora de Obesidade</b>
<b>Carboidrato</b> (% do VCT)	74,20	23,31
<b>Proteína</b> (% do VCT)	15,78	14,87
<b>Gordura total</b> (% do VCT)	10,02	61,82
<b>Calorias/g de dieta</b>	2,76	5,21

### 3.2 Desenho experimental

Os camundongos foram divididos em quatro grupos, de forma homogênea quanto ao peso corporal, dos quais dois deles receberam dieta AIN-93M (Eutróficos – Eut), e os outros dois receberam DIO (Obesos – Ob). Dos dois grupos que receberam dietas semelhantes, um deles foi infectado com *H. polygyrus* (Eut Inf e Ob Inf), e o outro não recebeu nenhum tratamento (Eut Ct e Ob Ct). A infecção foi realizada no primeiro dia do experimento juntamente com o início da dieta. Para isso, cada camundongo dos grupos infectados recebeu, por meio de gavagem oral, cerca de 200 larvas em estágio L3 de *H. polygyrus*.

Semanalmente foram avaliados parâmetros de: peso corporal, para acompanhar o desenvolvimento da obesidade; consumo alimentar, para verificar possíveis alterações devido a infecção; e número de ovos/g de fezes, para certificar a manutenção da infecção. O consumo alimentar foi mensurado por meio do cálculo da diferença entre o peso da dieta ofertada e o restante não consumido, sendo este valor ajustado pelo número de animais por gaiola e multiplicado pelas calorias por grama da respectiva dieta, apresentando assim o valor diário, em quilocalorias (kcal), consumido por cada animal. Já a quantificação de ovos/g de fezes foi aferida a partir da contagem de ovos em uma amostra de 40 µL de fezes frescas maceradas, com o auxílio de microscópio óptico (aumento 10x), e o resultado corrigido para o peso em grama de fezes.

Ao final das cinco ou oito semanas de experimentação os animais foram submetidos a Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI) e Tolerância Oral a Glicose (TTOG) para verificação do desenvolvimento de resistência à insulina. O tempo de jejum antecedente a

eutanásia variou de acordo com o objetivo do experimento, não ultrapassando 12 horas. Os animais foram eutanasiados por meio de injeção intraperitoneal de solução de ketamina (50 mg/Kg) e xilasina (20 mg/Kg) seguida de deslocamento cervical, conforme aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG). Após a eutanásia, ocorreu a retirada de sangue (por punção cardíaca), tecido adiposo epididimal (TAE), tecido adiposo mesentérico (TAM) e tecido adiposo subcutâneo (TAS). Os órgãos foram pesados e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em formaldeído 10% de acordo com a melhor técnica de conservação para análise posterior.

### **3.3 Análise histológica do tecido adiposo**

Fragmentos de tecido adiposo epididimal inicialmente fixados em solução de formaldeído 10% (24 horas) e posteriormente armazenados em álcool 70% foram submetidos a: inclusão em Paraplast, cortes em micrótomo a espessura de  $5\mu\text{m}$  e coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas resultantes destes procedimentos foram fotografadas por meio de câmera acoplada ao microscópio óptico (AxioCam MRc, Zeiss) no aumento de 20x.

A partir das fotos os adipócitos foram submetidos a análises morfométricas, no programa Image J 32, do maior e menor diâmetro dos mesmos. No total, foram analisados cinco animais por grupo, sendo que para cada animal 100 adipócitos foram submetidos a medição, totalizando assim 1.000 medidas por grupo de estudo.

### **3.4 Teste de Sensibilidade à Insulina**

Para avaliar o possível desenvolvimento de resistência à insulina, uma das consequências associadas à obesidade, foi realizado o Teste de Sensibilidade à Insulina. Este teste consiste na aplicação de insulina (0,75 U/Kg de peso corporal) por injeção intraperitoneal, seguido de mensuração do nível de glicose no sangue, antes da injeção e após 15, 30 e 60 minutos. Para a realização deste teste os animais não foram submetidos a

jejum (Santos et al., 2008). O teste foi realizado quatro dias antes do sacrifício, sendo que o sangue foi retirado da cauda dos animais e a glicemia aferida por um glicosímetro portátil, Accu-Check Performa (Roche, Diagnostics, USA). O resultado foi obtido a partir da leitura do glicosímetro e corrigido para percentual, sendo o valor da medida antes da injeção de insulina considerado como 100%.

### **3.5 Teste de Tolerância Oral a Glicose**

O Teste de Tolerância Oral a Glicose visa aferir indiretamente o funcionamento da insulina dos animais, pois verifica alterações na glicemia, ao longo do tempo, após injeção de glicose. Neste teste os animais foram submetidos a jejum de seis horas, seguido de gavagem oral de solução de D-Glicose (2g/Kg de peso corporal) e mensuração de glicemia antes da administração e após 15, 30, 60 e 120 minutos (Santos et al., 2008). O teste foi realizado dois dias antes do sacrifício e assim como no TSI o sangue foi retirado da cauda, a glicose aferida pelo mesmo glicosímetro portátil e o resultado obtido corrigido para percentual.

### **3.6 Avaliação do perfil lipídico e glicemia**

A glicemia e o perfil lipídico dos animais foram avaliados a partir da dosagem dos níveis séricos de glicose em jejum, colesterol total e colesterol HDL. Para isto foi coletado sangue por punção cardíaca, que foi imediatamente submetido a centrifugação, a 3.000 rpm por 10 minutos, para separação do soro. Este foi armazenado sob congelamento, a -70°C, até o momento da mensuração dos parâmetros a partir de kits enzimáticos comerciais (Labtest, Brasil). Para a realização destes testes, previamente a eutanásia, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas.

### *Glicose Jejum*

O nível de glicose em jejum é mensurado de acordo com o método da glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose formando ácido glucônico ( $C_6H_{12}O_7$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este último composto reage com a 4-aminoantipirina e fenol gerando uma antipirilquinonimina de coloração vermelha cuja intensidade é proporcional a quantidade de glicose (McMillin, 1990).

A concentração da glicose em jejum foi determinada em ensaio de microplaca de 96 poços, nos quais foram inseridos 2  $\mu$ L de soro puro ou padrão, ambos em duplicata, seguido de 200  $\mu$ L do reagente de cor. Após a homogeneização, a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos, e a absorbância lida a 505 nm em leitor de microplaca (Varioskan™ Flash Multimode Reader). O resultado, em mg/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este resultado multiplicado por 100, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão.

### *Colesterol Total e HDL*

O nível de colesterol total é obtido a partir da ação da enzima colesterol esterase que hidrolisa os ésteres de colesterol a colesterol livre. A enzima colesterol oxidase, oxida o colesterol livre formado a colest-4-en-ona, tendo peróxido de hidrogênio como subproduto da reação. O peróxido de hidrogênio produzido oxida fenol e 4-aminoantipirina, gerando uma coloração avermelhada diretamente proporcional a concentração de colesterol da amostra (Allain et al., 1974).

A concentração do colesterol total, assim como a da glicose em jejum, foi determinada em ensaio de microplaca de 96 poços, utilizando a mesma quantidade de soro, padrão e reagente de cor. A placa também foi incubada a 37°C por 10 minutos, e a absorbância lida a 500 nm em leitor de microplaca (Varioskan™ Flash Multimode Reader). O resultado, em mg/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este valor multiplicado por 200, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão.

Já o colesterol HDL foi medido a partir da precipitação inicial seletiva das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_4$ ) e cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). Após a adição dos precipitantes ao soro, a solução foi submetida a centrifugação de 3.500 rpm por 15 minutos, para obtenção do sobrenadante que foi utilizado para mensuração do HDL (Lopes-Virella, et al., 1977).

O sobrenadante obtido foi pipetado na microplaca de 96 poços e os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com o protocolo utilizado para medida do nível de colesterol total. Por fim, para calcular o nível de colesterol HDL, em mg/dL, foi realizado o cálculo da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e o resultado multiplicado por 40, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão.

### **3.7 Análise da expressão gênica**

Para avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose, síntese de adipocinas e inflamação, o tecido adiposo epididimal extraído foi colocado em tubo eppendorf livre de RNase e congelado a  $-70^{\circ}C$  até o momento do uso. Antes da realização da análise, o tecido precisou ser submetido a diversos procedimentos, iniciando com a extração de RNA, seguido de síntese de cDNA, para possibilitar enfim a quantificação da amplificação do cDNA por qPCR (reação quantitativa em cadeia da polimerase).

#### *Extração de RNA*

Para a extração de RNA, inicialmente uma pequena porção do tecido adiposo epididimal associado a 1 mL de trizol (TRI reagente, Sigma-Aldrich #T9424) foi submetido a maceração por homogeneizador de tecidos. Em seguida para remoção do excesso de conteúdo lipídico, o homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm,  $4^{\circ}C$  por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante.

Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) seguido de agitação vigorosa por 30 segundos, incubação a temperatura ambiente por cinco minutos e centrifugação a 13.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos. A fase superior resultante da centrifugação, foi transferida para outro eppendorf contendo 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ) e os líquidos misturados por inversão durante um minuto. Para auxiliar a precipitação do RNA, os tubos foram incubados a  $-70^\circ\text{C}$  por 90 minutos.

Ao término do período de incubação, as amostras foram centrifugadas, novamente, por 13.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  por 20 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e para lavagem do pellet formado, foi acrescido ao tubo 1 mL de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação nas mesmas condições, porém por 10 minutos. Após a repetição do processo de lavagem, os eppendorfs permaneceram abertos para evaporação de todo o etanol restante. Por fim, para ressuspensão do pellet foi acrescido ao tubo 30  $\mu\text{L}$  de água livre RNase. Para facilitar a dissolução do pellet na água, os tubos foram incubados em banho maria, a  $55^\circ\text{C}$  por 10 minutos.

A concentração do RNA, em  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , foi mensurada a partir da leitura em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND-1000). Para evitar degradação, o RNA permaneceu armazenado a  $-70^\circ\text{C}$  até a síntese do cDNA.

### *Síntese de cDNA*

A síntese de cDNA ocorreu a partir da transcrição do RNA em cDNA por meio da ação da transcriptase reversa (M-MLV RT). Inicialmente um micrograma de RNA foi diluído em 5  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase, e a esta diluição foi adicionado ainda 0,5  $\mu\text{L}$  de Oligo (dT) 15 primer (Promega #C1101). Este homogenato permaneceu no termociclador (PTC-100<sup>TM</sup>, MJ Research, Inc) a  $72^\circ\text{C}$  por 5 minutos.

Na etapa seguinte, sem retirar os tubos do termociclador foi acrescido um mix contendo: 2  $\mu\text{L}$  de tampão 5x de M-MLV, 0,5  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT (Promega #M1705), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (Promega #U1515), 0,1  $\mu\text{L}$  de inibidor de ribonuclease (Promega #N2511) e 0,25  $\mu\text{L}$  de água. Os tubos permaneceram no termociclador por três horas, a



42°C, seguido de aquecimento a 72°C por 15 minutos e resfriamento a 4°C. Após retirar os tubos do termociclador, houve diluição do cDNA formado a partir da adição de 90 µL de água livre de RNase. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização de qPCR.

#### *Amplificação do cDNA por qPCR*

2 µL de cDNA foram pipetados, em duplicata, na placa específica para qPCR, seguido de 13 µL do mix, que inclui: 0,2 µL de primer *forward*, 0,2 µL de primer *reverse*, 3 µL de 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermix (Solis BioDyne #08-36-00001) e 9,6 µL de água. Para garantir a homogeneização, a placa foi centrifugada a 2.000 rpm por um minuto.

A leitura foi realizada em máquina especializada (StepOnePlus™ Real Time PCR System) de acordo com o seguinte ciclo: 95°C por 12 minutos, 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos (estas últimas três etapas repetidas por 45 vezes), além da curva de dissociação. A análise inicial foi realizada por meio do programa StepOne Software (v2.3) que é associado a máquina de qPCR.

Os resultados foram obtidos em Ct (*threshold cycle*), que indica o ciclo em que o limiar de detecção da fluorescência da amostra foi alcançado pelo aparelho. Para a realização da análise da expressão do gene alvo, inicialmente os valores de amplificação foram normalizados em relação aos valores do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), gerando valores de  $\Delta Ct$ . Em seguida foi calculado o valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , no qual  $\Delta\Delta Ct$  corresponde a diferença entre o valor de  $\Delta Ct$  da amostra e média de  $\Delta Ct$  do grupo controle. A curva de dissociação também foi analisada e indicou a obtenção de apenas um único produto de amplificação, aferindo confiabilidade a leitura. A Tabela 2 indica a sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.

**Tabela 2:** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
GAPDH	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTTACACCGA
IL-10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
Leptina	CCTGTGGCTTTGGTCCTATCTG	AGGCAAGCTGGTGAGGATCTG
Receptor de Insulina	ATGAGGCCAACCTTCCTGGAA	ACGGGACATTCTCCATGTCT
TNF- $\alpha$	CGTCGTAGCAAACCACCAAG	GAGATAGCAAATCGGCTGACG

### 3.8 Isolamento adipócitos e células estromais

Os adipócitos do tecido adiposo epididimal foram isolados das outras células presentes no tecido, denominadas células estromais, para a avaliação da produção de adiponectina. Os adipócitos isolados permaneceram em cultura por 24 horas, enquanto as células estromais foram utilizadas para marcação de citometria de fluxo. Os procedimentos utilizados para isolamento dos adipócitos se basearam no protocolo desenvolvido por Rodbell (1964), que consiste basicamente em extração do tecido, digestão e separação das células por densidade.

Cerca de 1 g de tecido adiposo epididimal foi extraído do animal, em capela de fluxo laminar, e inserido em recipiente estéril contendo meio DMEM completo (DMEM, acrescido de 2% de Soro fetal bovino inativado e 0,2% de Penicilina/Estreptomicina). Caso o peso do tecido não atingisse 1 g foi realizado pool de dois ou mais animais do mesmo grupo.

Em seguida, o tecido foi transferido para outro recipiente estéril para ser submetido a digestão com 4 mg de colagenase (Sigma #C6885) acrescido a 3 mL de tampão de digestão, que é composto de: DMEM incompleto, 4% de Albumina bovina livre de ácidos graxos e 0,1% de Glicose. Após a degradação do tecido, por meio de cortes com tesoura cirúrgica, os tubos foram incubados por 40 minutos, 37°C sob agitação constante para finalização da digestão.

Após o término da incubação o conteúdo foi filtrado em rede de nylon e lavado três vezes com DMEM completo. Entre cada processo de lavagem o conteúdo foi submetido a centrifugação a 500 rpm, 4°C por 3 minutos. Após cada centrifugação o conteúdo dos tubos foi separado, sendo o infranadante retirado e armazenado para posterior isolamento das células estromais e as células do sobrenadante (adipócitos) submetidas ao processo consecutivo de lavagem. Finalizado o processo de lavagem, o sobrenadante restante, que corresponde aos adipócitos isolados, foi acrescido de 6 mL de DMEM completo, e submetido a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Posteriormente ao isolamento dos adipócitos, todo o infranadante armazenado (células estromais) foi centrifugado a 1.300 rpm, 4°C por 10 minutos, seguido do descarte do sobrenadante, ressuspensão das células em 1 mL de DMEM completo e contagem de células em câmara de Neubauer.

### **3.9 Cultura de adipócitos**

A suspensão contendo os adipócitos isolados ( $3 \times 10^5$  células em cada mL) foi cultivada em placa de 24 poços, sem adição de estímulo, e mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o término da incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até a realização do teste de ELISA (ensaio de absorção imunoenzimático).

### **3.10 ELISA para Adiponectina**

O ensaio de ELISA foi realizado a partir do kit para adiponectina (R&D Systems #DY1119), seguindo o protocolo recomendando pelo fabricante. Inicialmente ocorreu a sensibilização da placa com 100 µL de anticorpo de captura (2 µg/mL), seguido de incubação *overnight* a 4°C.

Após a incubação a placa foi submetida a três lavagens consecutivas com solução de lavagem, composta de 0,05% de Tween 20 diluído em tampão fosfato salino (PBS). Em

seguida a placa foi bloqueada com 300  $\mu\text{L}$  de reagente diluente (1% de albumina bovina sérica diluída em PBS), incubada a temperatura ambiente por uma hora e lavada três vezes após a incubação.

100  $\mu\text{L}$  de padrão e amostra foram adicionados a placa, que permaneceu em incubação a temperatura ambiente por duas horas. Após novo processo de lavagem, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção (25 ng/mL), seguido de nova incubação de duas horas. A placa foi lavada novamente e posteriormente ocorreu a adição de 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidina, que permaneceu em incubação por 20 minutos ao abrigo da luz.

Após uma nova lavagem foi adicionado a placa 100  $\mu\text{L}$  de solução de substrato, composto de: 12 mL Tampão Citrato (0,7% de fosfato dissódico e 0,5% de ácido cítrico diluído em água deionizada), 1,33 mL TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) e 2,66  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio, que permaneceu em incubação por 20 minutos também ao abrigo da luz. Por fim, foi adicionado 52  $\mu\text{L}$  da solução de parada (ácido sulfúrico 2N) e a leitura realizada em equipamento específico (Varioskan<sup>TM</sup> Flash Multimode Reader), a 450 nm.

### **3.11 Análise de estresse oxidativo**

Para verificar possíveis alterações nos mecanismos relacionados ao estresse oxidativo foram realizados três testes: atividade de superóxido dismutase (SOD), atividade de catalase e medida de formação de produtos da peroxidação de lípidos por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dois primeiros testes verificam mecanismos antioxidantes, enquanto o último mede diretamente um dos subprodutos relacionados ao estresse oxidativo.

O tecido adiposo mesentérico retirado foi congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Antes de iniciar os testes, 0,1 g de tecido foi acrescido a 1 mL de PBS e submetido a maceração em homogeneizador de tecido. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e o sobrenadante resultante da centrifugação transferido para outro eppendorf e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento de realização dos testes associados a estresse oxidativo.

Além da realização dos testes, as amostras foram submetidas a quantificação de proteínas totais, por meio de kit enzimático comercial (Labtest, Brasil). Esta dosagem de proteínas é essencial pois todos os resultados foram apresentados em relação a quantidade (g) de proteína presente na amostra correspondente. Neste teste 4  $\mu\text{L}$  de amostra e de padrão foram pipetados na placa, em seus respectivos poços, seguido de 200  $\mu\text{L}$  de reagente de cor e incubação a 37°C por 10 minutos. A leitura foi realizada a 545 nm e a quantificação de proteínas, em g/dL, calculada a partir da razão da absorbância do teste pela absorbância do padrão e o resultado multiplicado por 4, que corresponde a concentração em g/dL do padrão.

#### *Atividade de Superóxido Dismutase*

A ação de SOD é mensurada a partir da capacidade da enzima, presente na amostra, de limpar o radical superóxido do meio, que é gerado a partir da auto-oxidação de pirogalol. Esta oxidação gera um produto de cor que é passível de ser detectado a 570 nm. Quanto maior a quantidade de superóxido livre maior a taxa de oxidação do pirogalol, ou seja, o ensaio se baseia em impedir a reação do superóxido com o pirogalol, consequentemente impedindo a formação de cor (Dieterich et al., 2000).

As amostras (30  $\mu\text{L}$ ) foram pipetadas, em duplicata, na placa de 96 poços, seguidas de 99  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, composto por: 3% de fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e 13% de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) diluídos em água deionizada. Posteriormente foi adicionado 6  $\mu\text{L}$  de MTT a 1,25 mM e por fim 15  $\mu\text{L}$  de Pirogalol a 100  $\mu\text{M}$ . O padrão deste teste foi obtido a partir de dois poços, sem amostra, com 129  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e as mesmas quantidades de MTT e Pirogalol. A placa foi incubada a 37°C por cinco minutos e a reação interrompida com 150  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido). A leitura foi realizada no aparelho Varioskan<sup>TM</sup> Flash Multimode Reader, a 570 nm.

A partir da absorbância do teste de SOD associado a quantificação das proteínas da amostra foi possível obter o resultado em U de SOD/g de proteína. O valor de uma Unidade de SOD corresponde a média de absorbância do padrão. A partir deste valor, para calcular a quantidade de Unidades de SOD por amostra, foi realizado o cálculo da média da

absorbância das amostras, e o resultado dividido pelo valor correspondente a 1U de SOD. O resultado foi dividido pela concentração de proteína da amostra, gerando assim a quantidade de SOD, em U, por grama de proteína.

#### *Atividade de Catalase*

A quantificação da atividade de catalase é realizada a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio ao longo do tempo. Esta decomposição é observada pela diminuição da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade da enzima é então calculada a partir da diferença de absorbância por unidade de tempo (Aebi, 1984).

Uma cubeta de quartzo foi inserida ao espectrofotômetro e dentro dela adicionado: 1 mL de PBS, 25 µL de amostra e, após a calibração, 25 µL de solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. A temperatura do equipamento permaneceu a 37°C e foram realizadas leituras, a 240 nm, a cada 15 segundos até o tempo máximo de 60 segundos após a adição do peróxido de hidrogênio.

O valor da atividade de catalase foi obtido a partir do cálculo da diferença da absorbância a 0 segundos e 60 segundos, seguido da multiplicação do resultado por 0,025 (fator de diluição do peróxido de hidrogênio). Posteriormente foi calculada a razão da atividade de catalase pela quantificação de proteína, gerando o resultado em atividade de catalase/g de proteína.

#### *Quantificação da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico*

O ensaio de TBARS se baseia na reação do malondialdeído (MDA), presente na amostra, com o ácido tiobarbitúrico inserido, gerando uma solução de coloração avermelhada, cuja concentração pode ser mensurada a 535 nm. O MDA é utilizado neste ensaio pois é produzido naturalmente no organismo a partir da peroxidação lipídica, sendo considerado um importante marcador de estresse oxidativo (Wallin et al., 1993).

O ensaio de TBARS foi inicialmente realizado em tubos de vidro, nos quais foram inseridos 250 µL de amostra e padrão. Neste teste foram utilizados cinco padrões distintos,

que consistem em diferentes concentrações de MDA diluído em PBS. Em seguida foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução TBARS, composta de: 15% de ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), 0,375% de ácido tiobarbitúrico ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) e 4,16% de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ). Esta solução foi incubada em banho maria fervente, ao abrigo da luz, por 15 minutos e posteriormente resfriada em gelo por aproximadamente 10 minutos. Nos tubos frios foi adicionado 750  $\mu\text{L}$  de butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) seguido de agitação cuidadosa no vórtex e centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante desta centrifugação foi pipetado, em duplicata, na placa de 96 poços e a absorbância aferida a 535 nm.

O cálculo da concentração de TBARS foi baseado na equação da curva, que é construída a partir da média da absorbância dos padrões e suas respectivas concentrações. Após a determinação da equação, a média das absorbâncias das amostras foi inserida na fórmula, resultando na quantificação de MDA por amostra. Em seguida o resultado foi dividido pela concentração de proteína, gerando o dado de MDA/g de proteína.

### **3.12 Citometria de Fluxo**

Células estromais previamente isoladas, de acordo com o protocolo descrito acima, foram submetidas a análise de citometria de fluxo com o intuito de distinguir as populações celulares residentes no tecido adiposo. Para isto foram utilizados três painéis: Linfócitos B e Imunidade Inata, Células T reguladoras e Células Linfoides Inatas (ILCs) e Linfócitos T. Após o término das marcações os dados foram adquiridos no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e as análises realizadas com auxílio do programa FlowJo V10.1.

#### *Painel Linfócitos B e Imunidade Inata*

A marcação deste painel é capaz de detectar linfócitos B, basófilos, células dendríticas, eosinófilos, macrófagos, monócitos, neutrófilos e NKs. Para realizar esta marcação, as células foram pipetadas em placa específica ( $1 \times 10^6$  células por poço),

seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50  $\mu$ L), cuja quantidade dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 3. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100  $\mu$ L de tampão FACS (0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS), centrifugadas a 1.500 rpm, por 10 minutos, e fixadas com 100  $\mu$ L de paraformaldeído em incubação de 20 minutos. Após uma nova lavagem as células foram ressuspendidas em 200  $\mu$ L de tampão FACS para a realização da aquisição.

A estratégia de *gate* para análise deste painel (Figuras 5 e 6), foi iniciada a partir dos dados de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A) para a delimitação do *gate* de linfócitos, células pequenas e pouco granulosas, e de outros leucócitos, células de tamanho variado e maior granulosidade que incluem exatamente as células do sistema imune inato. Em seguida foi demarcado o *gate* de células únicas ou *singlets* (FSC-H x FSC-A), para excluir possíveis grumos celulares, e também o *gate* de *time* (SSC-A x TIME) para exclusão de eventuais interrupções na aquisição. A partir da demarcação destes três *gates* foi utilizada a ferramenta *Boolean Gate*, opção *Make and Gate*, para gerar a interseção destas três populações.

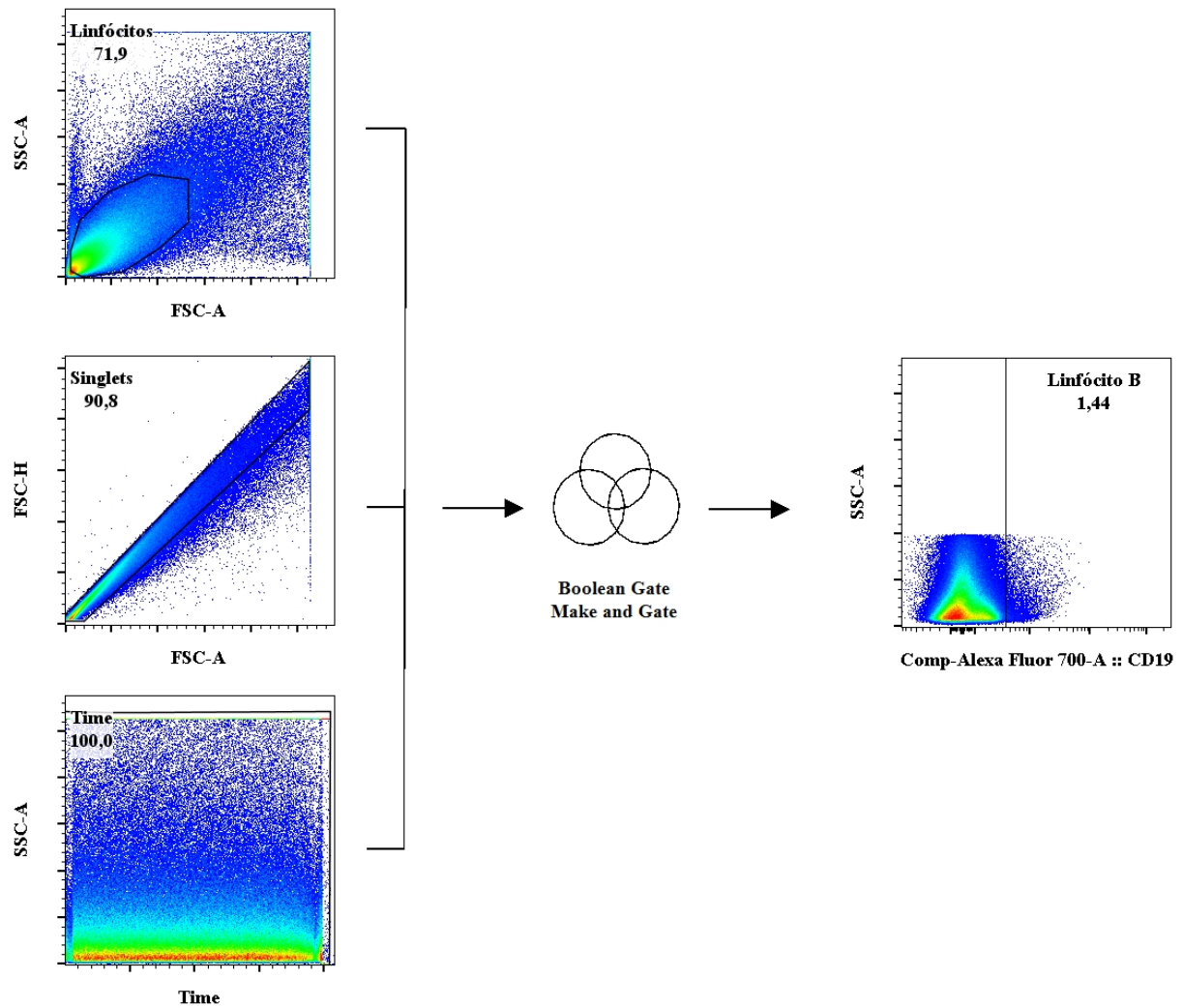
Considerando a população de linfócitos, uma nova demarcação a partir do *gate* de SSC-A x CD19 (Alexa Fluor 700) delimitou a população de linfócitos B, que é positiva para este marcador (Figura 5). Já os *gates* para determinação das células do sistema imune inato foram delimitados a partir da população de outros leucócitos. O primeiro deles, CD49 (FITC) x FC $\epsilon$ RI $\alpha$  (PE/Cy7) foi capaz de distinguir duas populações: NKs (CD49<sup>+</sup>FC $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>-</sup>) e basófilos (CD49<sup>+</sup>FC $\epsilon$ RI $\alpha$ <sup>+</sup>). A população de eosinófilos foi determinada pelo *gate* de CD11b<sup>int</sup> (APC) x SiglecF<sup>+</sup> (PE-CF594) e os neutrófilos por CD11b<sup>+</sup> x Ly6G<sup>+</sup> (PE). Em seguida foram analisadas as populações relacionadas com Ly6C (BV605) e Ly6G sendo a população negativa para os dois marcadores utilizada para determinação de macrófagos e células dendríticas, e a população Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> utilizada para determinação dos monócitos. Para complementar a determinação dos monócitos foi realizado o *gate* de SSC-A x CD11b, sendo que os monócitos correspondem a população positiva para este marcador. Dentro da população Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> foi delimitado o *gate* de CD11b<sup>high</sup> SiglecF<sup>-</sup> que determina os macrófagos, e também CD11c<sup>+</sup> (PercP Cy5.5) x IAIE<sup>high</sup> (BV 510), que delimita as células dendríticas. A população de macrófagos foi submetida a uma nova análise, a partir de



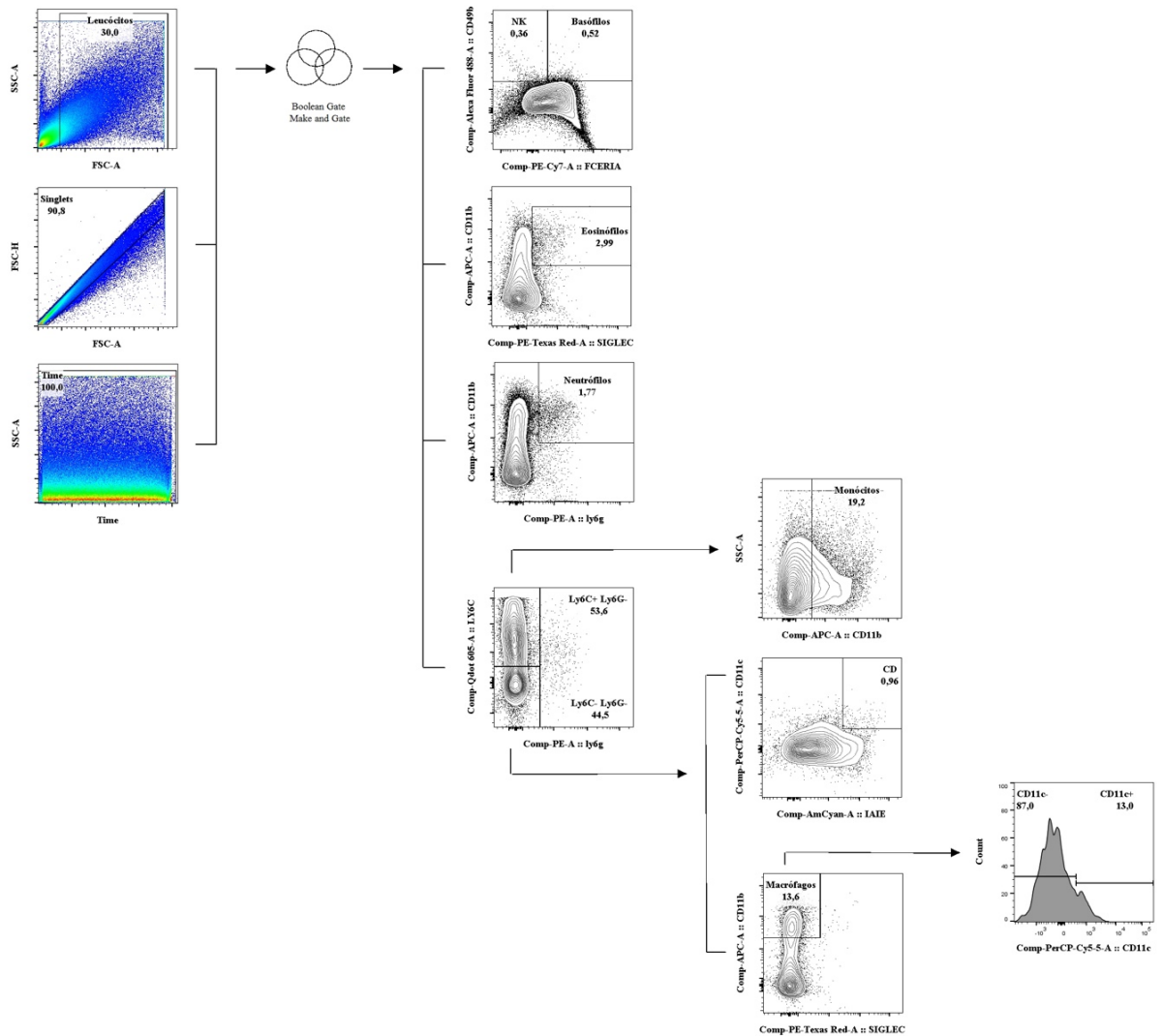
CD11c, considerando a população positiva para este marcador como macrófagos do tipo M1 (Figura 6).

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados no painel de Linfócitos B e Imunidade Inata, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em  $\mu\text{L}$ , para marcação de  $1 \times 10^6$  células

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Quantidade (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
CD11b (Biolegend #101211)	APC	0,01
CD11c (BD Pharmingen #560584)	PercP/Cy5.5	0,03
CD19 (Biolegend #108905)	Alexa Fluor 700	0,06
CD49 (Biolegend #108905)	FITC	0,25
FC $\epsilon$ RI $\alpha$ (Biolegend #134317)	PE/Cy7	1,25
IAIE (Biolegend #107635)	BV510	0,31
Ly6C (Biolegend #128035)	BV605	0,15
Ly6G (Biolegend #127607)	PE	0,03
SiglecF (BD Horizon #562757)	PE-CF594	0,01



**Figura 5: Estratégia de *gate* painel Linfócitos B.** Inicialmente foram demarcados os *gates* de linfócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME), e a partir da interseção dos mesmos foi delimitada a população de linfócitos B (SSC-A x CD19).



**Figura 6: Estratégia de gate painel de Imunidade Inata.** Inicialmente foram delimitados os *gates* de leucócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos foram determinadas as populações de NKs ( $CD49^+ FC\epsilon RI\alpha^-$ ), basófilos ( $CD49^+ FC\epsilon RI\alpha^+$ ), eosinófilos ( $CD11b^{int} SiglecF^+$ ) e neutrófilos ( $CD11b^+ Ly6G^+$ ). A partir do *gate* de  $Ly6C^+ Ly6G^-$ , foram delimitados os monócitos (SSC-A x CD11b) e por fim, considerando  $Ly6C^- x Ly6G^-$  foram delimitadas as populações de macrófagos ( $CD11b^{high} SiglecF^-$ ) e células dendríticas ( $CD11c^+ IAIE^{high}$ ). Dentro da população de macrófagos, a partir do histograma, foram delimitadas as populações  $CD11c^+$  e  $CD11c^-$ , sendo  $CD11c^+$  a população de macrófagos M1.

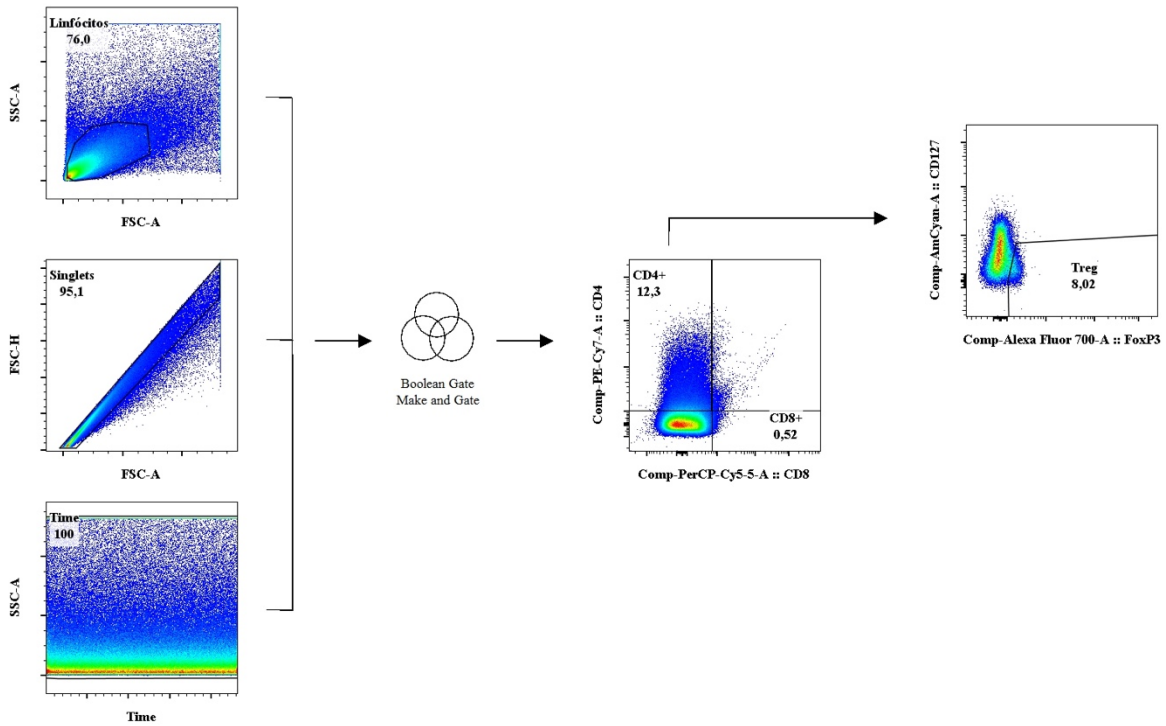
### *Painel células T reguladoras*

Os anticorpos utilizados neste painel foram destinados a identificação exclusiva da população de células T reguladoras. As células foram pipetadas em placa específica ( $1 \times 10^6$  células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50  $\mu\text{L}$ ) que permaneceu em incubação por 30 minutos. Depois da primeira lavagem, com tampão FACS, as células foram fixadas e permeabilizadas com 100  $\mu\text{L}$  de FixPerm (eBioscience #00552300). Após incubação de 20 minutos, as células foram novamente lavadas agora com 100  $\mu\text{L}$  de PermWash e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida ocorreu a marcação intracelular (50  $\mu\text{L}$ ) por 45 minutos, ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4°C. Após três lavagens consecutivas, com PermWash, as células foram enfim ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão FACS para serem adquiridas no citômetro. A quantidade dos anticorpos extra e intracelulares utilizados neste painel estão descritas na tabela 4.

Novamente para iniciar a análise foram delimitados os *gates* de linfócitos, *singlets* e *time*, seguido da interseção das três populações para posterior delimitação das células T reguladoras, como demonstrado na figura 7. A partir do *gate* de linfócitos e análise de CD4 (PE/Cy7) x CD8 (PercP/Cy5.5), foi delimitada a população CD4<sup>+</sup>, que após analisada considerando CD127 (BV510) x FoxP3 (Alexa Fluor 700), resultou na delimitação das células T reguladoras que são CD4<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup>.

**Tabela 4:** Anticorpos utilizados no painel de células T reguladoras, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em  $\mu\text{L}$ , para marcação de  $1 \times 10^6$  células

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Quantidade (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
CD4 (Biolegend #116015)	PE/Cy7	0,03
CD8 (Biolegend #100733)	PercP/Cy5.5	0,625
CD127 (Biolegend #135033)	BV510	0,625
FoxP3 (eBioscience #56577382)	Alexa Fluor 700	0,06



**Figura 7: Estratégia de *gate* painel células T reguladoras.** Inicialmente foram determinados os *gates* de linfócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos delimitada a população CD4<sup>+</sup>. Em seguida, foram selecionadas as células CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> que correspondem as Tregs.

### *Painel Células Linfoides Inatas e Linfócitos T*

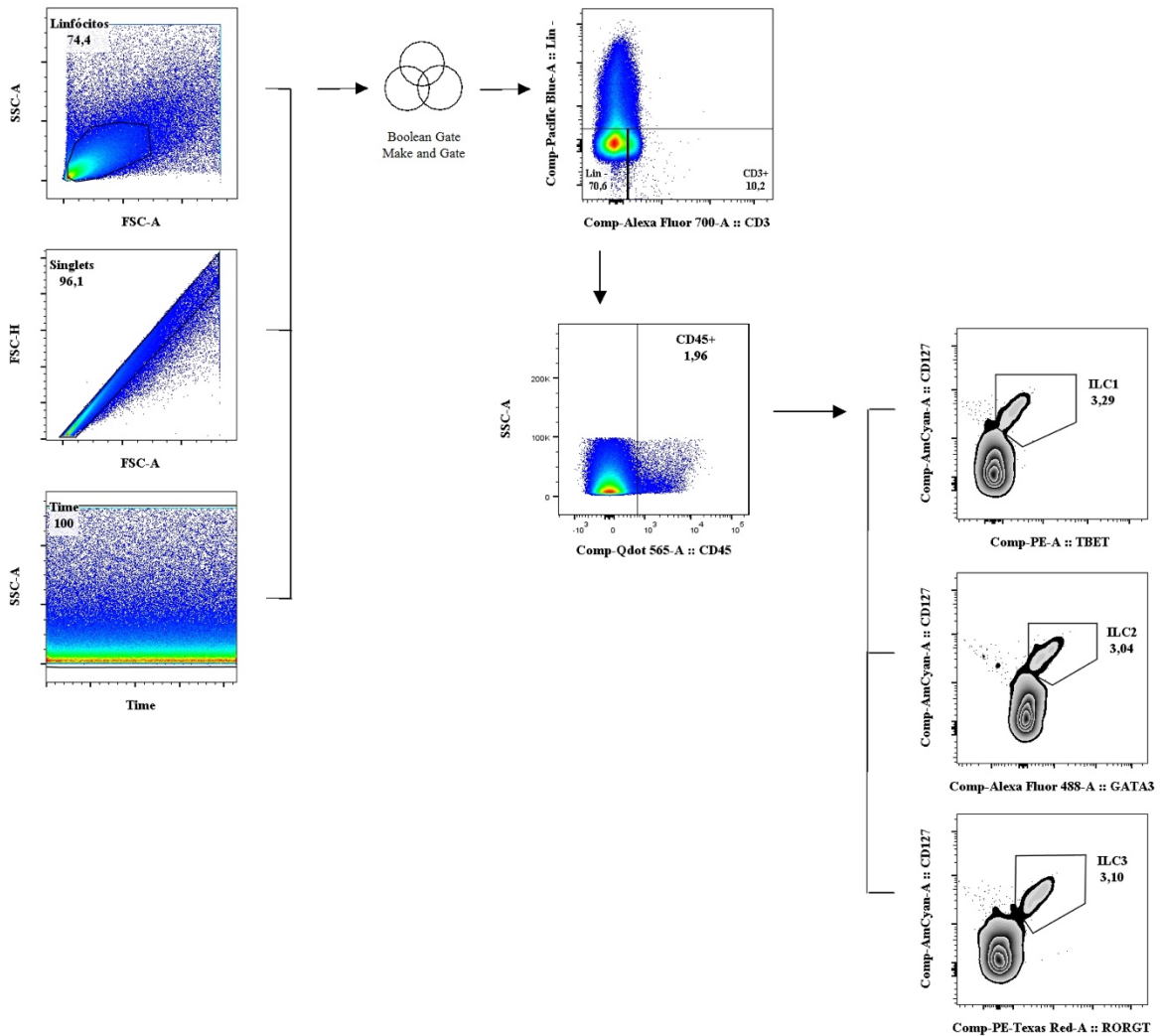
A partir da marcação deste painel foi possível distinguir além das subpopulações de ILC (ILC 1, 2 e 3), as células T *helper* e suas subpopulações (Th1, Th2, Th17) e as células T citotóxicas. O processo de marcação extra e intracelular ocorreu da mesma maneira descrita para o painel de células T reguladoras, e a quantidade dos anticorpos utilizados está descrita na tabela 5.

Para análise das subpopulações de ILC (Figura 8) a população de linfócitos, resultante da interseção dos *gates* de linfócitos, *singlets* e *time*, foi analisada considerando linhagem negativa (CD11b, CD11c, CD16, CD19, FcεRIα - Pacific Blue) x CD3 (Alexa Fluor 700), sendo selecionada a população negativa para ambos os marcadores. Posteriormente, considerando SSC-A x CD45 (BV570) foi delimitada a população CD45<sup>+</sup>, que em seguida ao ser analisada por CD127 (BV510) x Tbet (PE) / GATA 3 (Alexa Fluor 488) / RORγt (PE-CF594), resultou, respectivamente, nas ILC 1, 2 e 3.

As populações de células T também foram delimitadas a partir do *gate* de linfócitos, porém considerando as células CD3<sup>+</sup> (Figura 9). Em seguida foram demarcadas as populações positivas para CD4 (PE/Cy7) ou CD8 (PercP/Cy5.5). Dentro das células consideradas CD4<sup>+</sup>, a partir dos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e RORγt foi possível identificar as células Th1, Th2 e Th17 respectivamente.

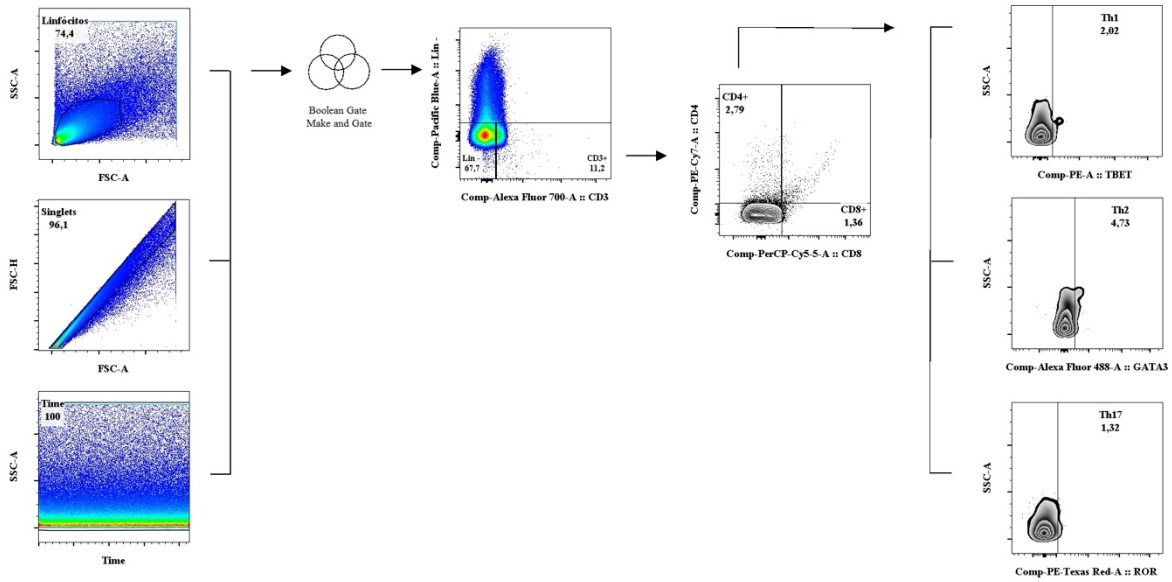
**Tabela 5:** Anticorpos utilizados no painel de Células Linfoides Inatas e Linfócitos T, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em  $\mu\text{L}$ , para marcação de  $1 \times 10^6$  células

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Quantidade (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
CD3 (Biolegend #100215)	Alexa Fluor 700	0,06
CD4 (Biolegend #116015)	PE/Cy7	0,03
CD8 (Biolegend #100733)	PercP/Cy5.5	0,625
CD11b (Biolegend #101223)	Pacific Blue	0,25
CD11c (Biolegend #117321)	Pacific Blue	0,25
CD16 (BD Horizon #560539)	Pacific Blue	0,01
CD19 (Biolegend #115526)	Pacific Blue	0,01
CD45 (Biolegend #103135)	BV570	0,07
CD127 (Biolegend #135033)	BV510	0,625
Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ (Biolegend #134313)	Pacific Blue	2,5
GATA 3 (Biolegend #653807)	Alexa Fluor 700	0,625
ROR $\gamma$ t (BD Horizon #562684)	PE-CF594	0,07
Tbet (Biolegend #644809)	PE	0,625



**Figura 8: Estratégia de *gate* painel Células Linfoides Inatas.** Inicialmente foram delimitados os *gates* de linfócitos (SSC-A x FSC-H), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultantes foi analisada em linhagem negativa x CD3, sendo selecionada a população negativa para ambos os marcadores. Em seguida foi delimitada a população CD45<sup>+</sup>, que a partir do *gate* de CD127<sup>+</sup> associado aos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e RORγt resultou nas populações de ILC1, 2 e 3 respectivamente.





**Figura 9: Estratégia de *gate* painel Linfócitos T.** Inicialmente foram delimitados os *gates* de linfócitos (SSC-A x FSC-H), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultante foi analisada em linhagem negativa x CD3, sendo selecionada a população positiva apenas para CD3. Em seguida o *gate* de CD4 x CD8 resultou nas células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) e T helper (CD4<sup>+</sup>), esta última ao ser analisada pelos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e ROR $\gamma$ t resultou nas subpopulações, Th1, Th2 e Th17, respectivamente.

### **3.13 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prim, versão 7.0. Inicialmente foi avaliada a normalidade de cada dado através do teste D'Agostino-Pearson ou Shapiro-Wilk, para dados cujo  $n$  fosse menor que oito. Em seguida, os dados que assumiram a distribuição normal foram submetidos ao teste t de Student ou ANOVA (One ou Two way) e aqueles que não seguiram distribuição normal foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis. Os resultados foram apresentados pela média e erro padrão da média e o nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

### **3.14 Questões éticas**

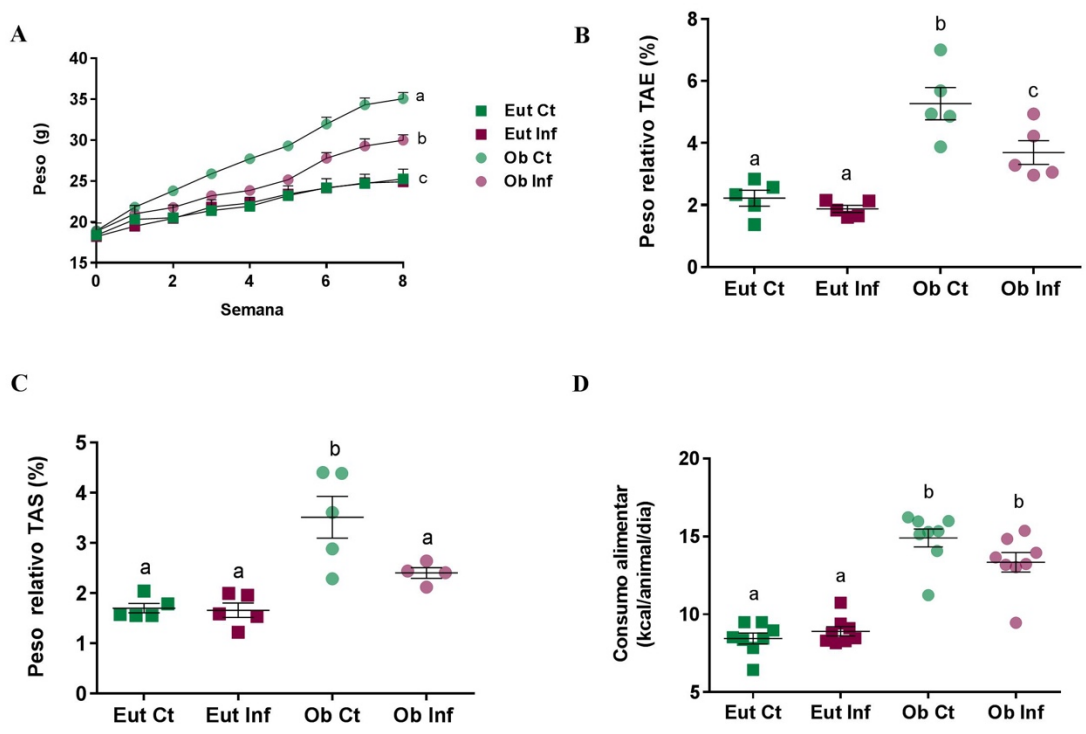
O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o protocolo 78/2012.

## 4 RESULTADOS

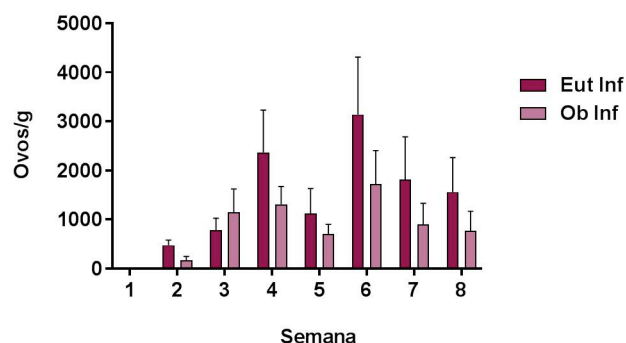
### 4.1 Infecção helmíntica previne o ganho exarcebado de peso em animais submetidos à dieta hiperlipídica, apesar de manter inalterado o consumo calórico

Primeiramente objetivou-se investigar o efeito da infecção helmíntica em parâmetros relacionados ao ganho de peso (peso corporal e dos tecidos) e consumo alimentar. No geral foi possível constatar que o grupo Ob Inf não ganha peso de maneira exacerbada como ocorre no Ob Ct e que esta diferença não é consequência de alterações no consumo alimentar do Ob Inf (Figura 10). Além disso, a realização de exames de fezes semanais demonstrou a manutenção da infecção ao longo de todo o experimento e que o tratamento com diferentes dietas não altera o número de parasitas no hospedeiro, já que não foi possível observar diferença entre o número de ovos/g entre os grupos Eut Inf e Ob Inf (Figura 11).

Foram realizados cinco experimentos nos quais foi possível observar diferença entre o peso dos Ob Ct e Ob Inf a partir da terceira semana, sendo esta diferença mantida até o fim do experimento (Figura 10A). Os grupos Eut Ct e Eut Inf não apresentaram diferença de ganho de peso entre si, mas ganharam menos peso que ambos os grupos obesos (Figura 10A). Em relação ao peso de TAE e TAS é possível perceber que o grupo Ob Inf, possui menor índice destes parâmetros quando comparado ao Ob Ct, condizendo com o resultado de ganho de peso (Figura 10 B e C). Estas diferenças de peso entre os Ob Ct e Ob Inf não ocorrem devido a alterações no consumo alimentar, que apesar de ser maior para os grupos que receberam dieta hiperlipídica ( $14,12 \pm 1,9$  kcal/animal/dia) em comparação a dieta controle ( $8,68 \pm 0,9$  kcal/animal/dia), não há diferença de consumo entre os grupos que receberam a mesma dieta (Figura 10D).



**Figura 10: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* atenua o ganho de peso em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica por oito semanas, apesar de não alterar o consumo calórico.** Aumento da massa corporal (g) dos quatro grupos ao longo das oito semanas de experimentação (A). Peso relativo em percentual do tecido adiposo epididimal (B) e subcutâneo (C) em relação ao peso corporal final. Média do consumo alimentar (kcal/animal/dia) dos diferentes grupos (D). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e representativos de um experimento (n = 5). A e D 2way ANOVA, B e C One-way ANOVA. Letras diferentes indicam  $p < 0.05$ .



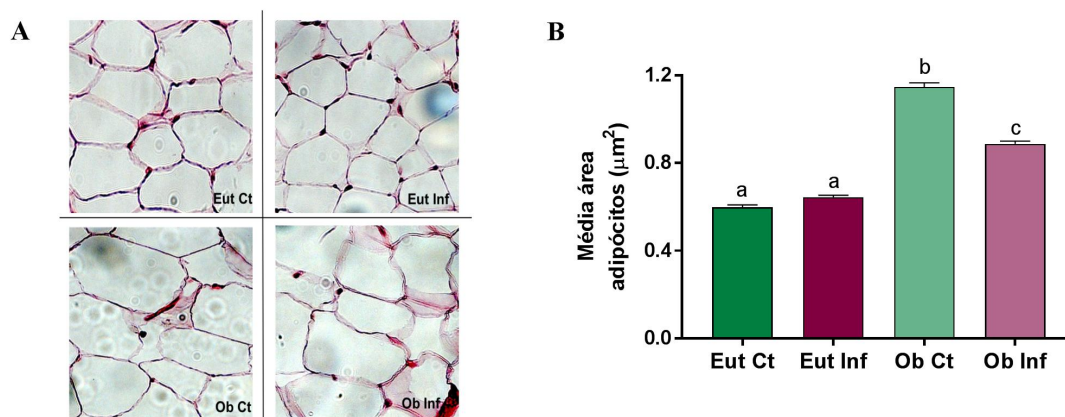
**Figura 11: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* é mantida ao longo de todo o período experimental.** Número de ovos/g de fezes ao longo de oito semanas de experimentação. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e representativos de um experimento (n = 5). Teste t de Student.

#### **4.2 Infecção helmíntica previne o aumento exacerbado na área dos adipócitos de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**

Dietas hiperlipídicas além de causar alterações metabólicas, são capazes de gerar alterações morfológicas, principalmente no tecido adiposo. Estas alterações surgem como resposta dos adipócitos, que tendem a aumentar em tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia), à necessidade de estocar a energia excedente proveniente da dieta (Jo et al., 2009). Neste contexto objetivou-se verificar o possível desenvolvimento de hipertrofia nos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e o efeito da infecção sob este parâmetro.

Ao realizar o cálculo da área dos adipócitos foi possível constatar aumento no tamanho destas células nos grupos Ob Ct e Inf quando comparados aos Eut Ct e Inf. No entanto, ao comparar apenas os grupos Ob foi possível observar que a hipertrofia desenvolvida pelos animais Ob Ct é superior a apresentada pelos Ob Inf (Figura 12A e B). Este fato é observado de forma mais clara na análise da frequência de adipócitos por área, já que no grupo Ob Inf mais de 60% dos adipócitos possuem área entre 0,1 e 1,0  $\mu\text{m}^2$ ,

enquanto nos Ob Ct esta mesma porcentagem ocorre em áreas de  $1,1 \mu\text{m}^2$  até maiores que  $1,5 \mu\text{m}^2$  (Tabela 6).



**Figura 12: Infecção helmíntica previne o desenvolvimento de hipertrofia exacerbada em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** Cortes histológicos (HE) do tecido adiposo epididimal (A) de experimento com oito semanas e média do valor da área dos adipócitos analisados (B) ( $n = 500$ ). Resultado expresso como média  $\pm$  erro padrão da média. 2way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

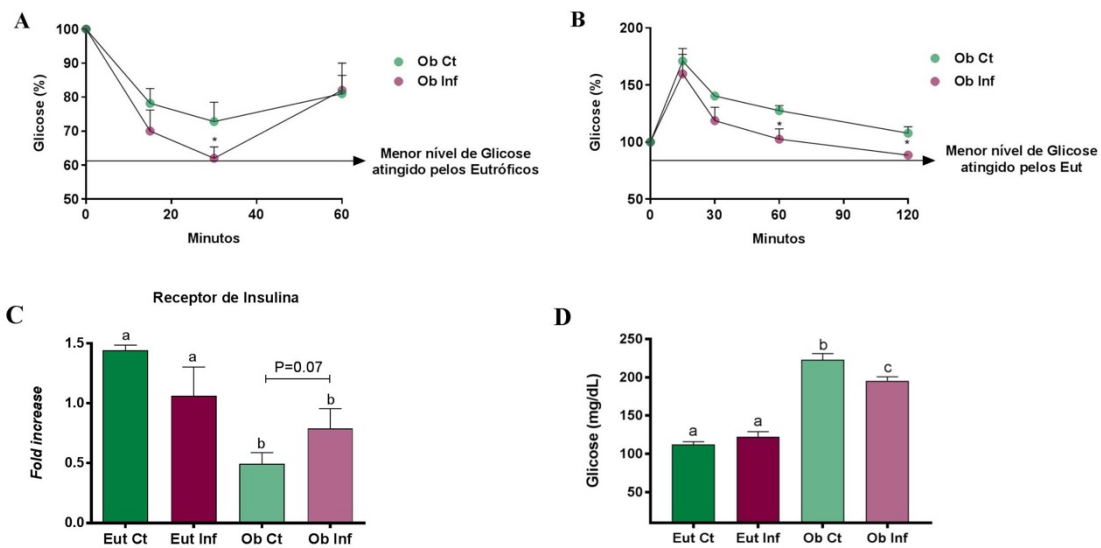
**Tabela 6:** Frequência de adipócitos (%), por grupo de estudo, de acordo com a área dos mesmos

Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Frequência de adipócitos (%)			
	Eut Ct	Eut Inf	Ob Ct	Ob Inf
0,1 – 0,5	40	42	4	11
0,6 – 1,0	52	54	37	56
1,1 – 1,5	8	4	42	28
> 1,5	0	0	17	5

### **4.3 Infecção helmíntica melhora parâmetros relacionados a síndrome metabólica**

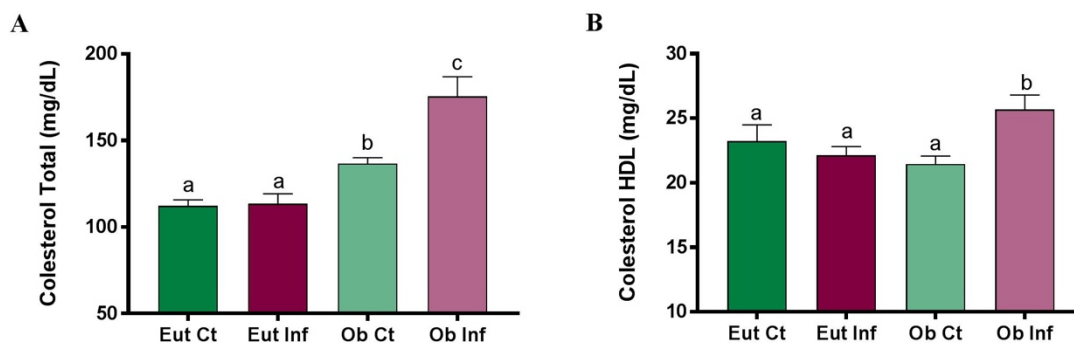
Uma das consequências relacionadas a obesidade é o desenvolvimento de síndrome metabólica, que inclui fatores como: desenvolvimento de resistência à insulina, aumento dos níveis séricos de glicose em jejum, aumento do colesterol total e diminuição do colesterol HDL, aumento de triglicerídeos, entre outros (NIH, 2016). Levando em consideração este fato, após submeter os animais à dieta hiperlipídica objetivou-se verificar alterações nos parâmetros relacionados a esta síndrome e também a possível capacidade de reversão destas alterações devido a infecção.

Em relação a resistência à insulina, o TSI mostrou que os animais do grupo Ob Inf atingem menores níveis de glicose no sangue quando comparados aos Ob Ct, e além disso, aos 30 minutos de teste, os Ob Inf conseguem atingir um valor de glicemia semelhante ao atingido pelos animais eutróficos (Figura 13A). No TTOG, quando foi testada o funcionamento da própria insulina dos animais, novamente foi possível perceber uma melhor resposta dos Ob Inf que demonstraram níveis menores de glicose no sangue, além de atingirem, no final do teste, um valor de glicemia mais próximo da glicose normal (Figura 13B). Associado a estes testes, foi mensurada, por qPCR, a expressão do gene relacionado ao receptor de insulina, demonstrando que a dieta hiperlipídica reduz a expressão deste receptor, porém a infecção parece melhorar os níveis de expressão desse receptor, embora o teste não tenha sido estatisticamente significativo ( $P=0,07$ ) (Figura 13C). Outro parâmetro importante relacionado ao nível de glicose no sangue é a glicemia em jejum, que foi mensurada por kit enzimático comercial. A partir deste teste foi possível perceber que a glicemia em jejum está aumentada nos grupos Ob (212 mg/dL) quando comparados aos Eut (114 mg/dL), mas que o aumento no grupo Ob Inf é menor (199 mg/dL) quando comparado ao Ob Ct (223 mg/dL) (Figura 13D). Em relação aos níveis séricos de colesterol total e HDL, também mesurados por kits enzimáticos comerciais, foi possível perceber que o grupo Ob Inf possui a maior concentração de colesterol total no soro (186 mg/dL), porém este aumento está relacionado ao aumento do colesterol HDL, que também apresenta maior concentração neste grupo (25 mg/dL) quando comparado aos outros três (23, 22 e 22 mg/dL) (Figura 14A e B).



**Figura 13: Infecção helmíntica melhora resistência à insulina e glicose em jejum em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** Níveis de glicose no sangue no Teste de Sensibilidade à Insulina (A) e Teste de Tolerância Oral a Glicose (B) em experimento de cinco semanas (n = 5). Expressão do receptor de insulina (C) no tecido adiposo epididimal em experimento de oito semanas (n = 5). Nível de glicose no soro (D) medido a partir de kit enzimático em experimento de cinco semanas (n = 10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. A e B teste t de Student, C e D One way ANOVA. \* e letras diferentes p<0.05.





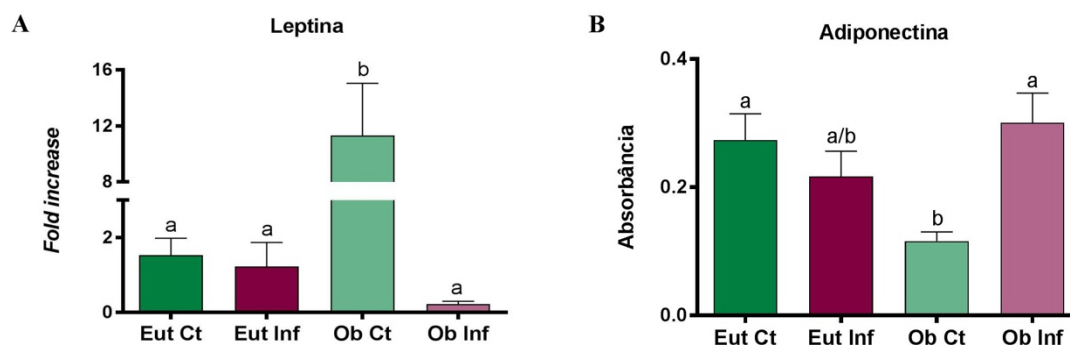
**Figura 14: Aumento dos níveis séricos de colesterol total e HDL em camundongos infectados submetidos à dieta hiperlipídica.** Nível de colesterol total (A) e colesterol HDL (B) no soro, mensurados a partir de kits enzimáticos, em experimento de cinco semanas ( $n = 10$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A e B One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

#### 4.4 Infecção helmíntica impede a desregulação da produção de adipocinas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

As adipocinas são importantes mediadores solúveis responsáveis pela manutenção da homeostase metabólica (Tilig e Moschen, 2006). Em condições como obesidade há desregulação na produção destas adipocinas, podendo levar ao desenvolvimento de doenças metabólicas (Cao, 2014). Dentre as adipocinas, leptina e adiponectina correspondem aos mediadores mais abundantes no tecido adiposo, sendo relacionados, respectivamente, a saciedade e ao metabolismo de glicose (Sørensen et al., 1996; Chadran et al., 2003). Considerando esta tendência de desregulação na produção de adipocinas em condições de obesidade, objetivou-se avaliar as possíveis alterações na produção das mesmas nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e o efeito da infecção nesta desregulação.

Ao mensurar a expressão de leptina, no TAE, foi possível constatar uma desregulação desse gene no grupo Ob Ct, cuja expressão se demonstra superior à dos outros três grupos (Figura 15A). A secreção de adiponectina, pelos adipócitos cultivados, também se demonstra alterada, sendo a quantidade produzida pelos Ob Ct inferior a produzida pelos

outros grupos (Figura 15B). Vale ressaltar que apesar de o grupo Ob Inf também ser alimentado com dieta hiperlipídica, não houve nestes animais desregulação na produção de ambas as adipocinas.

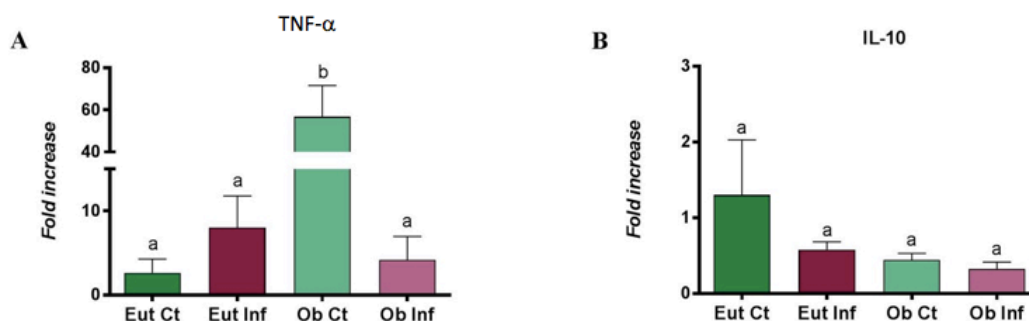


**Figura 15: Desregulação na produção de adipocinas nos animais não infectados submetidos à dieta hiperlipídica.** Expressão de leptina (A) no tecido adiposo epididimal no experimento de oito semanas ( $n = 5$ ) e absorbância resultante do teste de ELISA para adiponectina (B), em sobrenadante de cultura de adipócitos isolados, experimento com cinco semanas ( $n = 5$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A e B One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

#### **4.5 Infecção helmíntica diminui a inflamação no tecido adiposo de maneira, aparentemente, independente a produção de IL-10**

O estado de inflamação crônica do tecido adiposo é um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento das consequências da obesidade (Gregor e Hotamisligil, 2011). Desta forma uma redução na inflamação poderia resultar no controle do peso e em melhorias nos parâmetros metabólicos. Sendo assim, com o intuito de buscar mecanismos responsáveis pelas melhorias observadas nos Ob Inf, a expressão de genes relacionados a inflamação foi avaliada.

Ao avaliar a expressão de TNF- $\alpha$ , uma das principais citocinas inflamatórias, foi possível perceber um aumento na expressão deste gene no grupo Ob Ct, aumento que não ocorre nos Ob Inf e nos Eut Ct e Inf (Figura 16A). Porém ao avaliar a expressão de IL-10, uma das principais citocinas anti-inflamatórias, não foi possível observar diferenças na expressão deste gene entre os quatro grupos de estudo (Figura 16B).



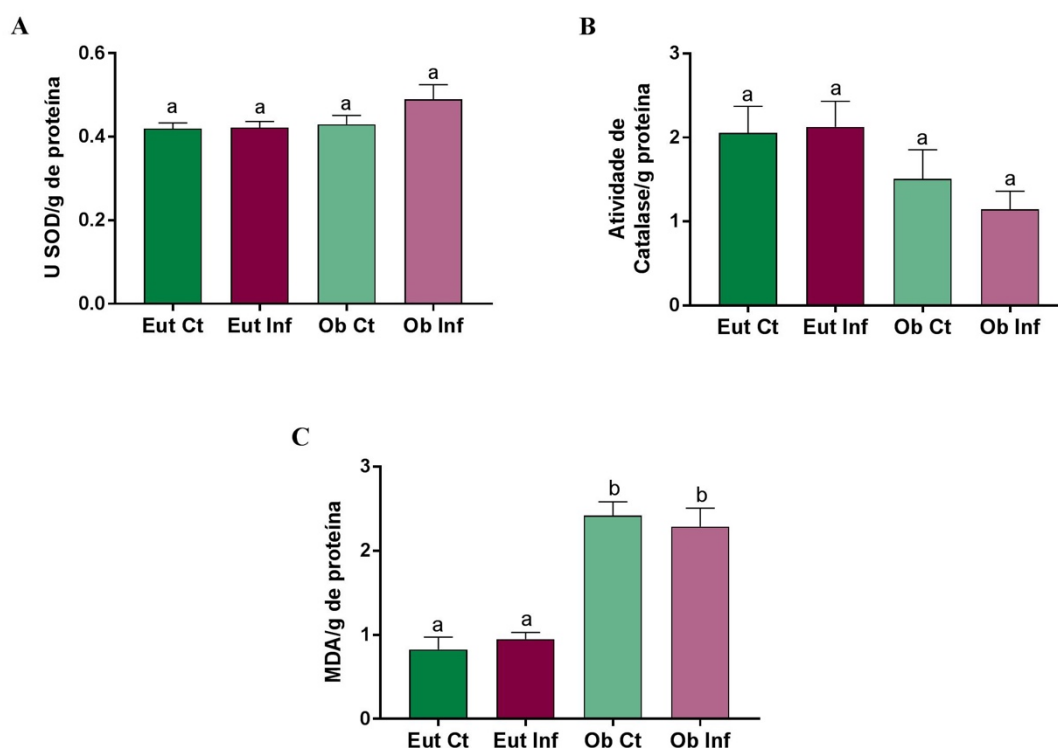
**Figura 16: Infecção helmíntica diminui a expressão de citocina inflamatória, sem alterar expressão de citocina anti-inflamatória em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.** Expressão de TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) no tecido adiposo epididimal, mensurada por qPCR em experimento de oito semanas (n = 5). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A e B One way ANOVA. Letras diferentes p < 0.05.

#### **4.6 Dieta hiperlipídica mantém inalterados mecanismos antioxidantes apesar de aumentar o estresse oxidativo**

O aumento do estresse oxidativo associado a diminuição dos mecanismos antioxidantes, corresponde a outra desregulação danosa observada na obesidade (Marseglia et al., 2015). Além disso, a presença do parasita no hospedeiro também pode levar ao aumento de estresse oxidativo já que esta condição corresponde a um dos mecanismos de expulsão do parasita (Smith et al., 2013). Considerando estes fatos, as condições experimentais em questão se apresentam como potenciais fatores de aumento de estresse

oxidativo, portanto foram realizados testes para a verificação de possíveis alterações nestes parâmetros.

Em relação aos mecanismos antioxidantes, atividade de superóxido dismutase e catalase, não foram observadas diferenças entre os quatro grupos de estudo (Figura 17A e B). No entanto, ao avaliar a concentração de MDA, uma das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, foi possível perceber um aumento na concentração da mesma nos animais alimentados com dieta hiperlipídica submetidos ou não a infecção (Figura 17C).



**Figura 17: Dieta hiperlipídica não altera mecanismos antioxidantes, apesar de aumentar o estresse oxidativo.** Atividade de superóxido dismutase (A), atividade de catalase (B) e concentração de MDA (C) por grama de proteína, mensurados por ensaios específicos no experimento de cinco semanas (n = 10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A, B e C One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

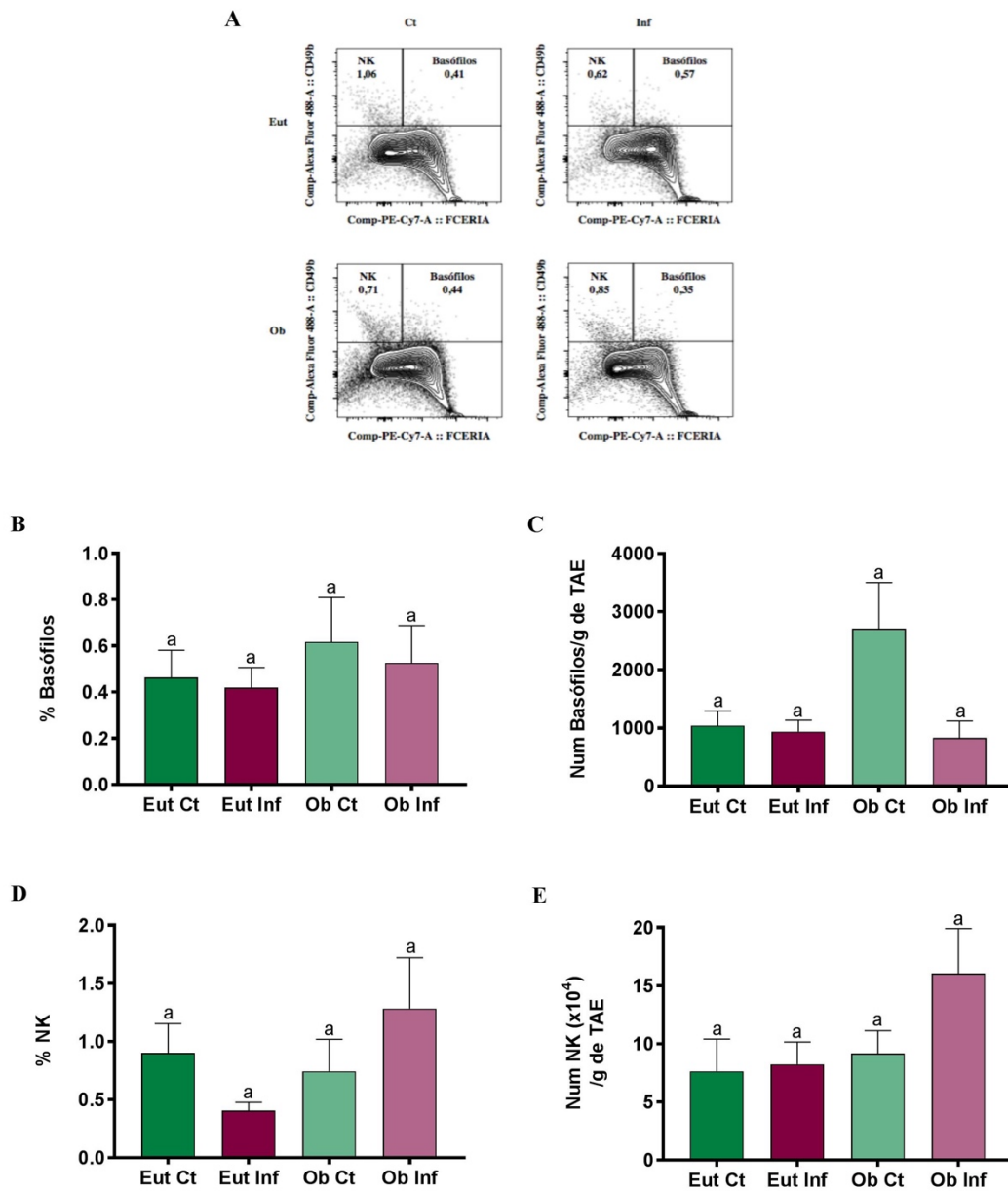
#### **4.7 Infecção helmíntica aumenta a migração de células reguladoras para o tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica, apesar de manter inalterada a migração de células inflamatórias para o mesmo local**

A migração de células inflamatórias (NKs, macrófagos, linfócitos T CD8<sup>+</sup>), associada a diminuição de células reguladoras no tecido adiposo corresponde a outro fator essencial para o estabelecimento da inflamação no tecido durante a obesidade (Gregor e Hotamisligil, 2011). Considerando esta realidade, a alteração no infiltrado inflamatório, a partir da diminuição de células pró-inflamatórias e do aumento de células reguladoras, resultaria na diminuição da inflamação, o que poderia explicar as melhoras observadas no grupo Ob Inf. Neste contexto foram realizadas análises de citometria de fluxo, com o intuito de caracterizar as populações de células residentes no tecido adiposo.

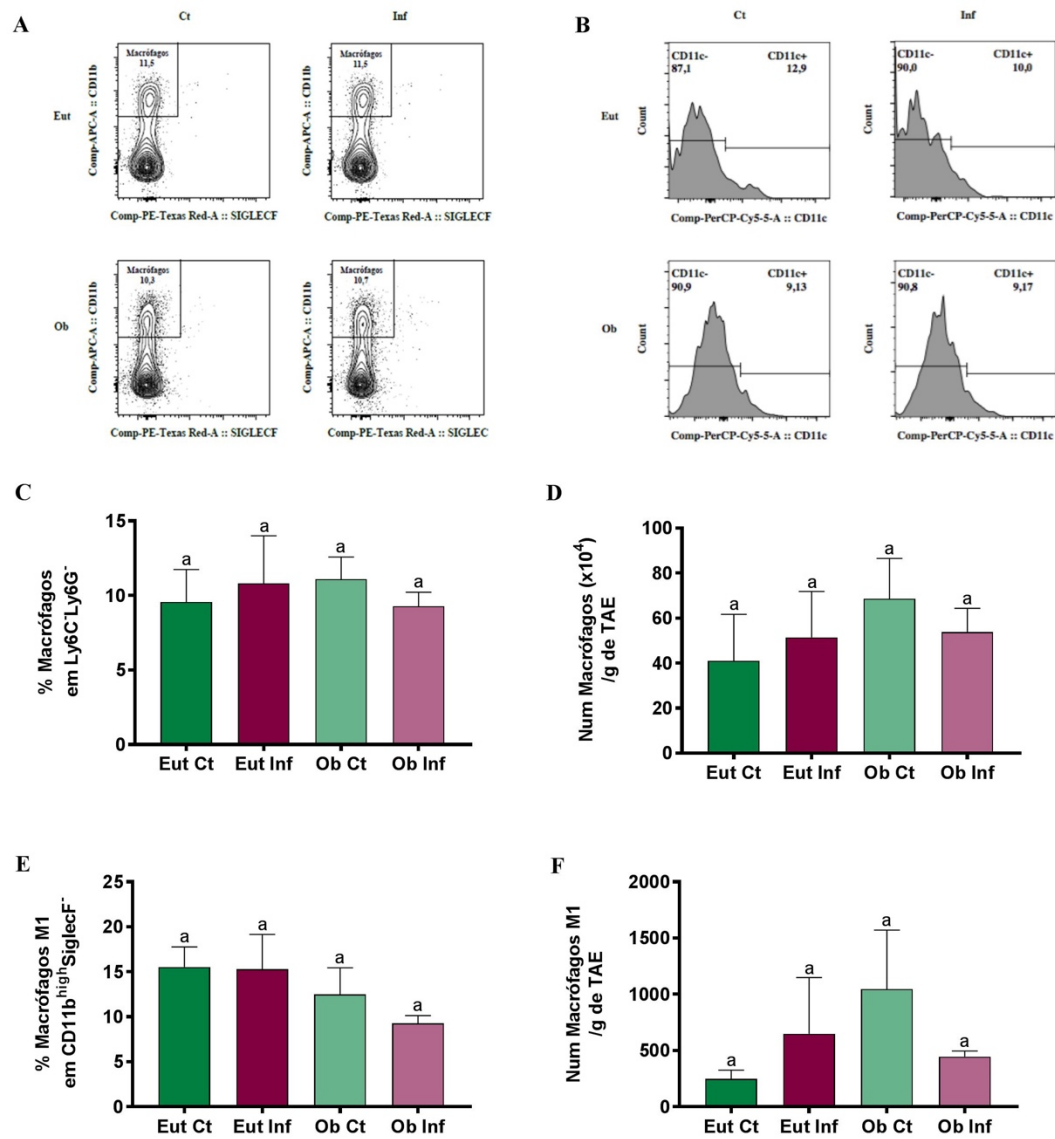
Em relação ao painel de Linfócitos B e Imunidade Inata, a maioria das populações analisadas, incluindo basófilos e NKs (Figura 18), macrófagos e macrófagos M1 (Figura 19), células dendríticas (Figura 20), neutrófilos (Figura 21) e linfócitos B (Figura 22), não apresenta alterações na migração para o tecido adiposo, considerando tanto porcentagem quanto número de células (por grama de tecido adiposo epididimal). No entanto, foi possível observar aumento na porcentagem de: eosinófilos nos grupos infectados (Figura 23) e monócitos no grupo Ob Ct (Figura 24). Considerando as células T reguladoras, há uma diminuição na porcentagem das mesmas em ambos os grupos submetidos a dieta hiperlipídica, porém esta diminuição é menos significativa no grupo infectado quando comparado ao não infectado (Figura 25). Em relação ao número de células só há redução no grupo Ob Ct quando comparado aos outros três grupos.

No painel de células linfoides inatas foi possível observar alterações tanto nas subpopulações de ILC quanto nas populações de células Th. Iniciando pelas ILC1, há aumento da porcentagem das mesmas em ambos os grupos Ob quando comparados aos Eut, sendo que esta diferença também pode ser observada ao analisar o número de células (por grama de TAE) (Figura 26). Em relação às ILC2, há aumento na porcentagem das mesmas

em ambos os grupos Ob quando comparados aos Eut, porém o número de células só se apresenta aumentado no grupo Ob Ct quando comparado aos outros três grupos (Figura 27). A população de ILC3 apresenta aumento, em porcentagem, nos grupos Eut Inf, Ob Ct e Ob Inf quando comparados ao grupo Eut Ct. Ao analisar o parâmetro de número de células (ILC3) por grama de tecido adiposo, a população de ILC3 se apresenta aumentada em ambos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica, quando comparados ao grupo Eut Ct, porém não há aumento nestes grupos quando comparado ao Eut Inf (Figura 28). Considerando as subpopulações de Th, a porcentagem de Th1 se apresenta diminuída no grupo Ob Ct quando comparado ao Eut Ct, sem haver alterações no número de células (por grama de TAE) nos quatro grupos de estudo (Figura 29). A subpopulação de Th2 não apresenta diferença de migração no tecido adiposo nos quatro grupos de estudo, analisando tanto porcentagem quanto número de células (Figura 30). Considerando a subpopulação de Th17, foi possível observar aumento de porcentagem e número de células nos grupos Ob quando comparados aos Eut (Figura 31).

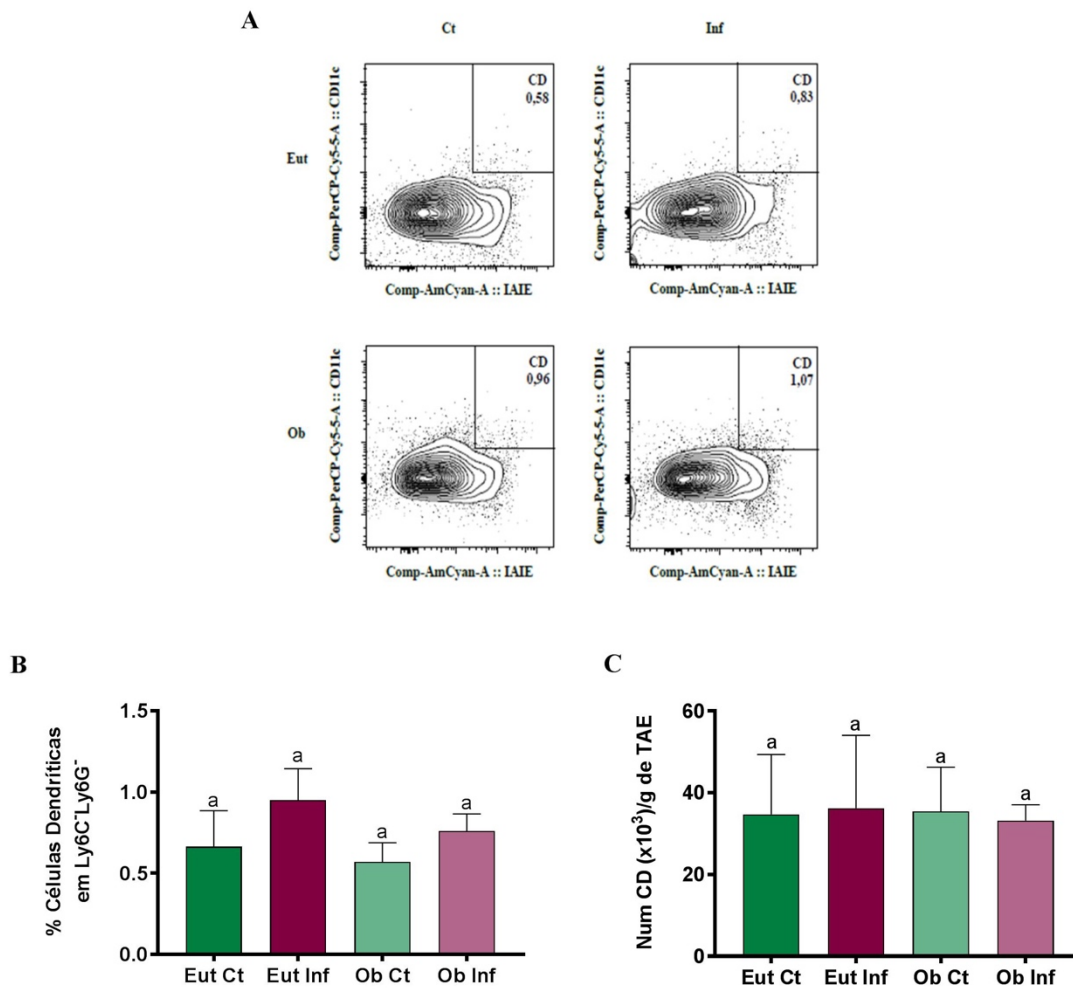


**Figura 18: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de basófilos e células NKs para o tecido adiposo.** *Dot plots* representativos da população de basófilos ( $CD49^{+}Fc\epsilon RI\alpha^{+}$ ) e NKs ( $CD49^{+}Fc\epsilon RI\alpha^{-}$ ) (A) nos quatro grupos de estudo. Porcentagem e número de células por grama de tecido adiposo epididimal de basófilos (B e C) e NKs (D e E) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas ( $n=10$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B, C, D e E One way ANOVA.

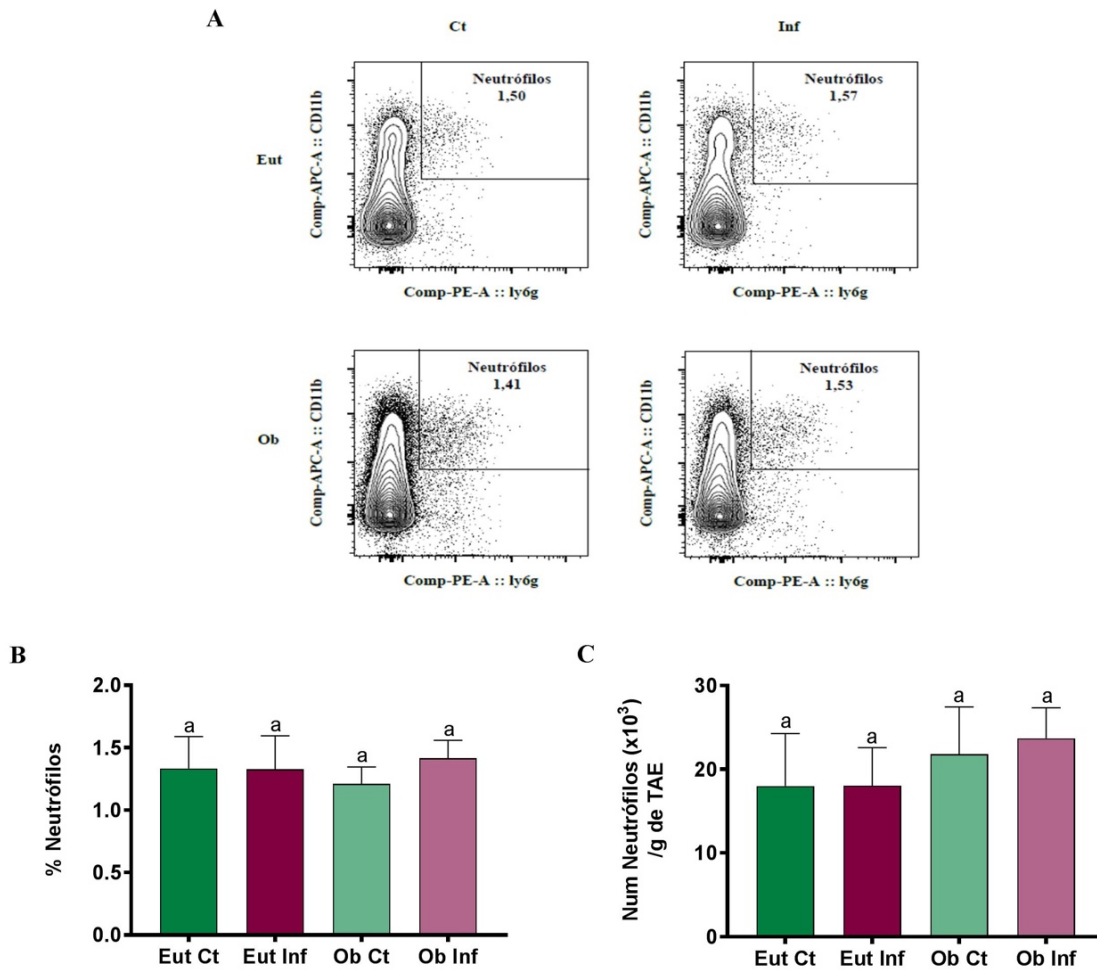


**Figura 19: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de macrófagos e macrófagos M1 para o tecido adiposo.** *Dot plots* representativos da população de macrófagos (Ly6C<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>SiglecF<sup>-</sup>) (A) e macrófagos M1 (Ly6C<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>SiglecF<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>) (B) nos quatro grupos de estudo. Porcentagem e número de células por grama de tecido adiposo epididimal de macrófagos (C e D) e macrófagos M1 (E e F) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. C, E e F One way ANOVA. B Kruskal – Wallis.

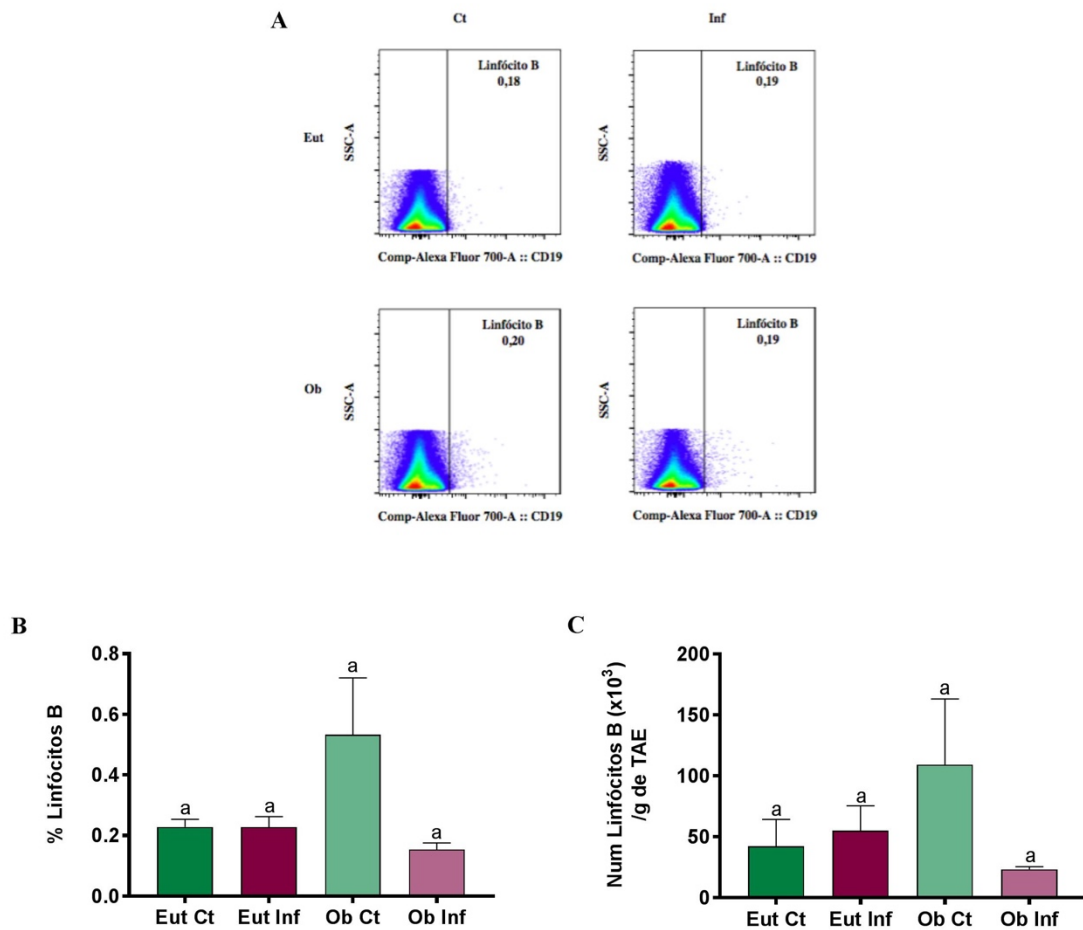




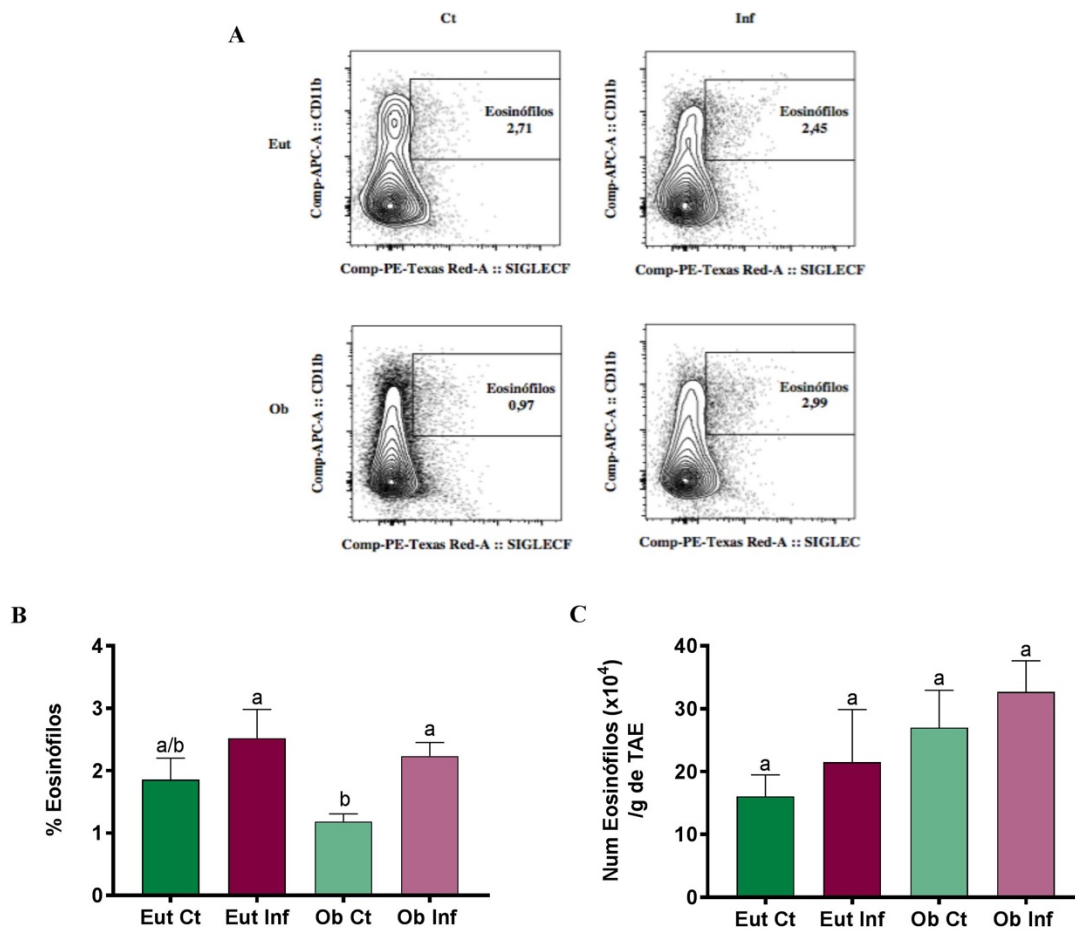
**Figura 20: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de células dendríticas para o tecido adiposo.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de células dendríticas (Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>IAIE<sup>high</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.



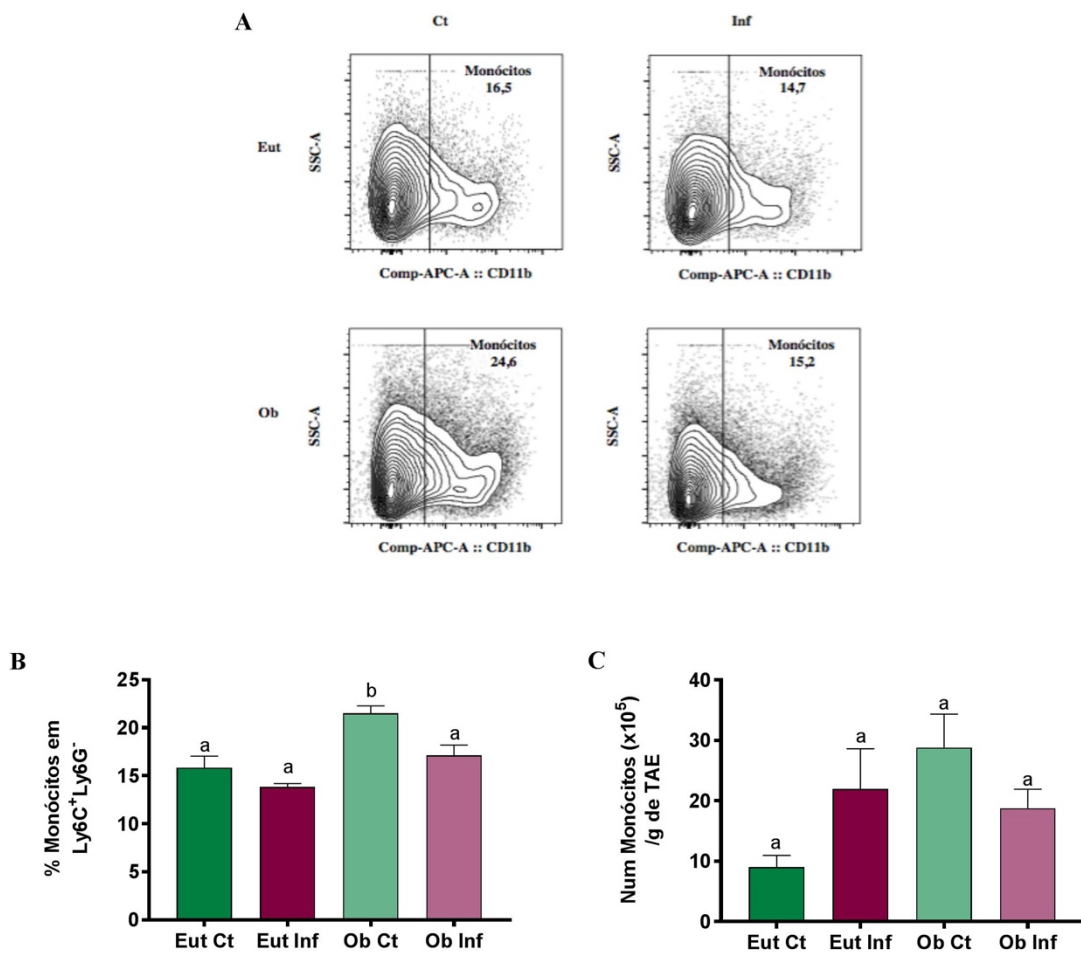
**Figura 21: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de neutrófilos para o tecido adiposo.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.



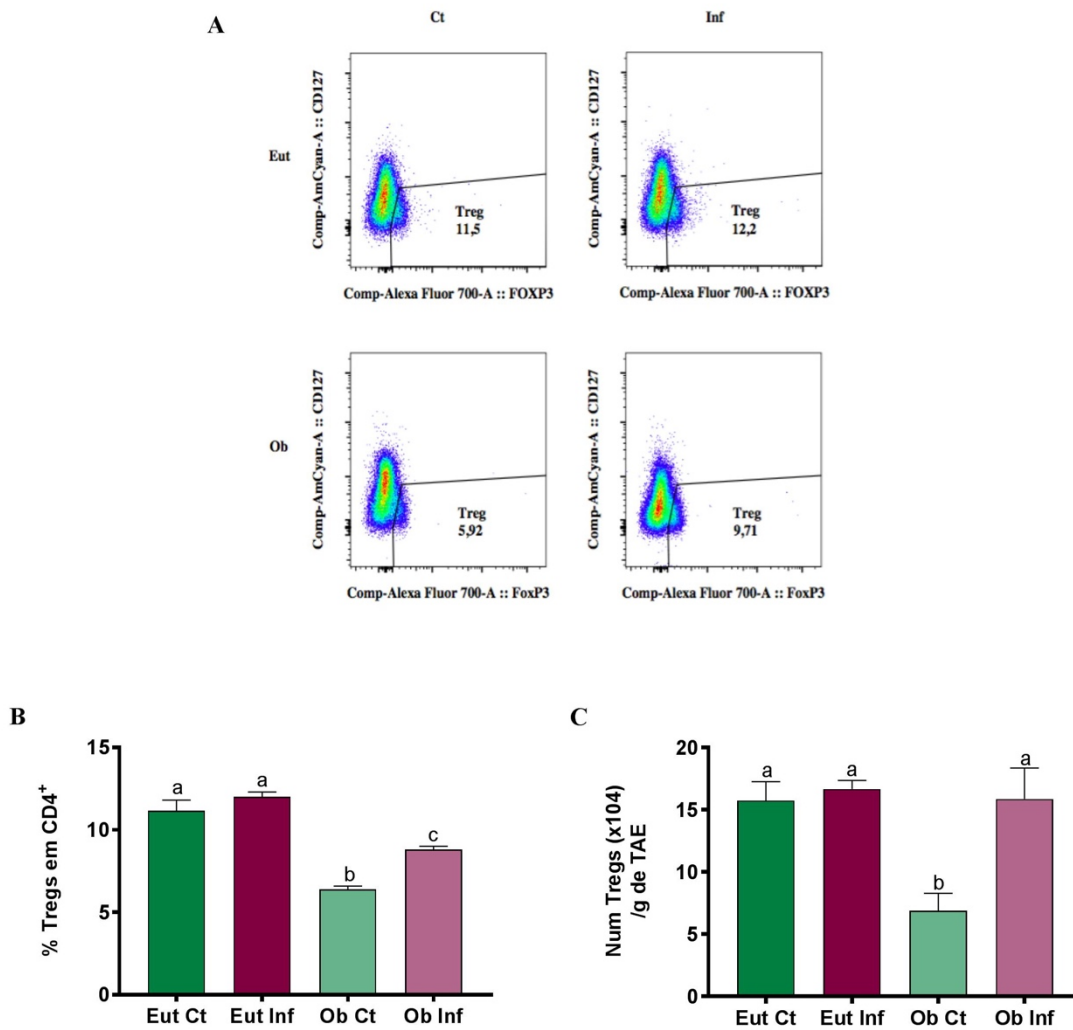
**Figura 22: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de linfócitos B para o tecido adiposo.** *Dot plots* representativos da população de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) (A) nos quatro grupos de estudo. Porcentagem e número de células por grama de tecido adiposo epididimal de linfócitos B (B e C) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA.



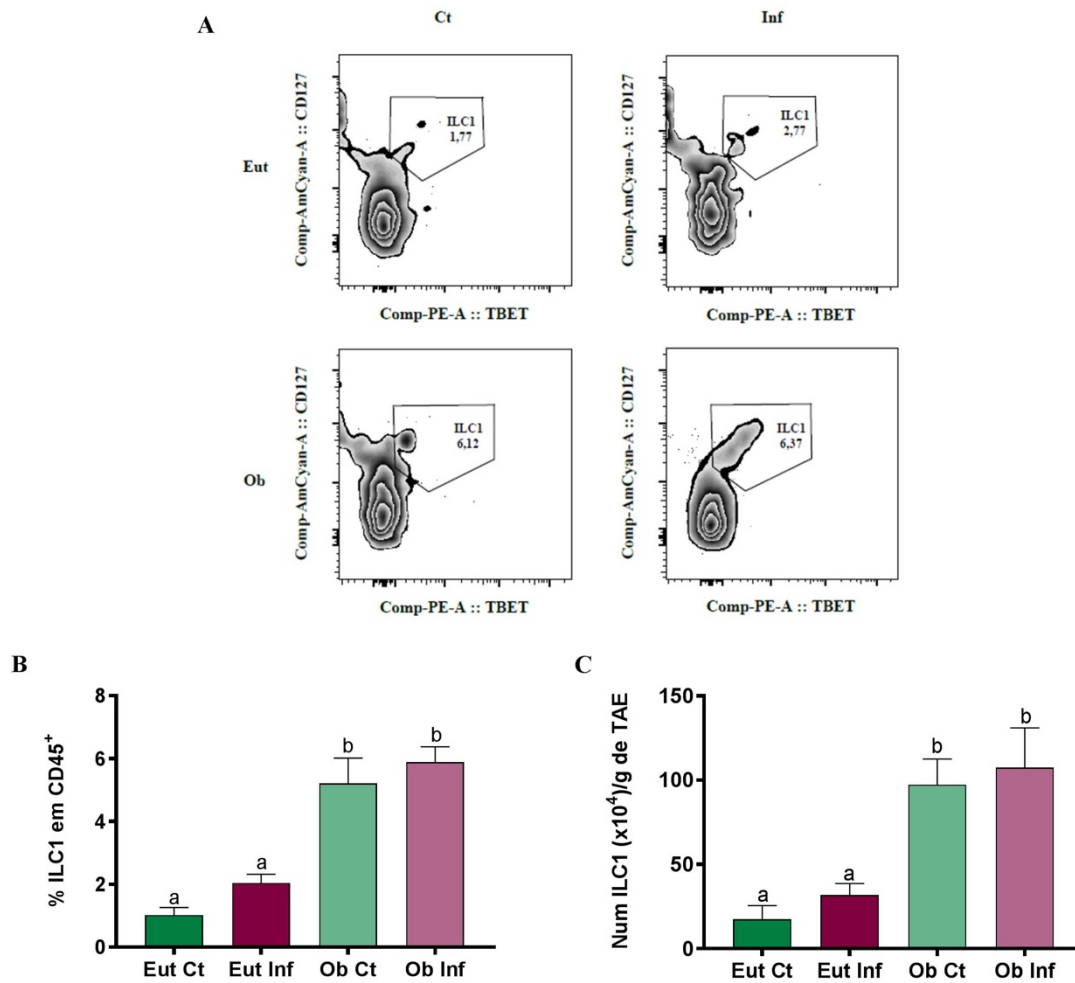
**Figura 23:** Animais infectados com *Heligmosomoides polygyrus* apresentam maior porcentagem de eosinófilos no tecido adiposo, independente de serem submetidos ou não à dieta hiperlipídica. *Dot plots* representativos da população de eosinófilos (CD11b<sup>int</sup> SiglecF<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo. Porcentagem e número de células por grama de tecido adiposo epididimal de eosinófilos (B e C) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.



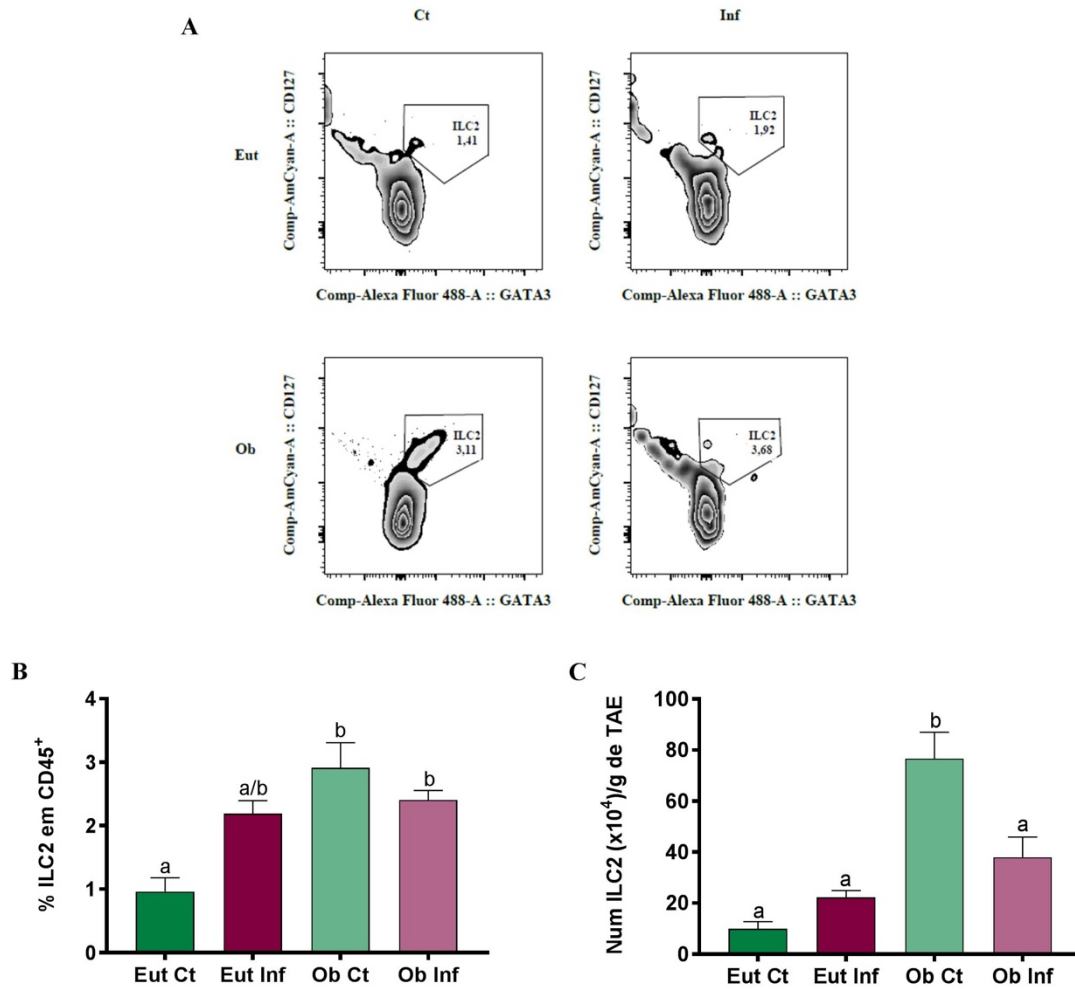
**Figura 24: Dieta hiperlipídica aumenta a porcentagem de monócitos no tecido adiposo de animais não submetidos a infecção.** Dot plots (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de monócitos (Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.



**Figura 25: Infecção helmíntica previne a redução no número de células T reguladoras no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.

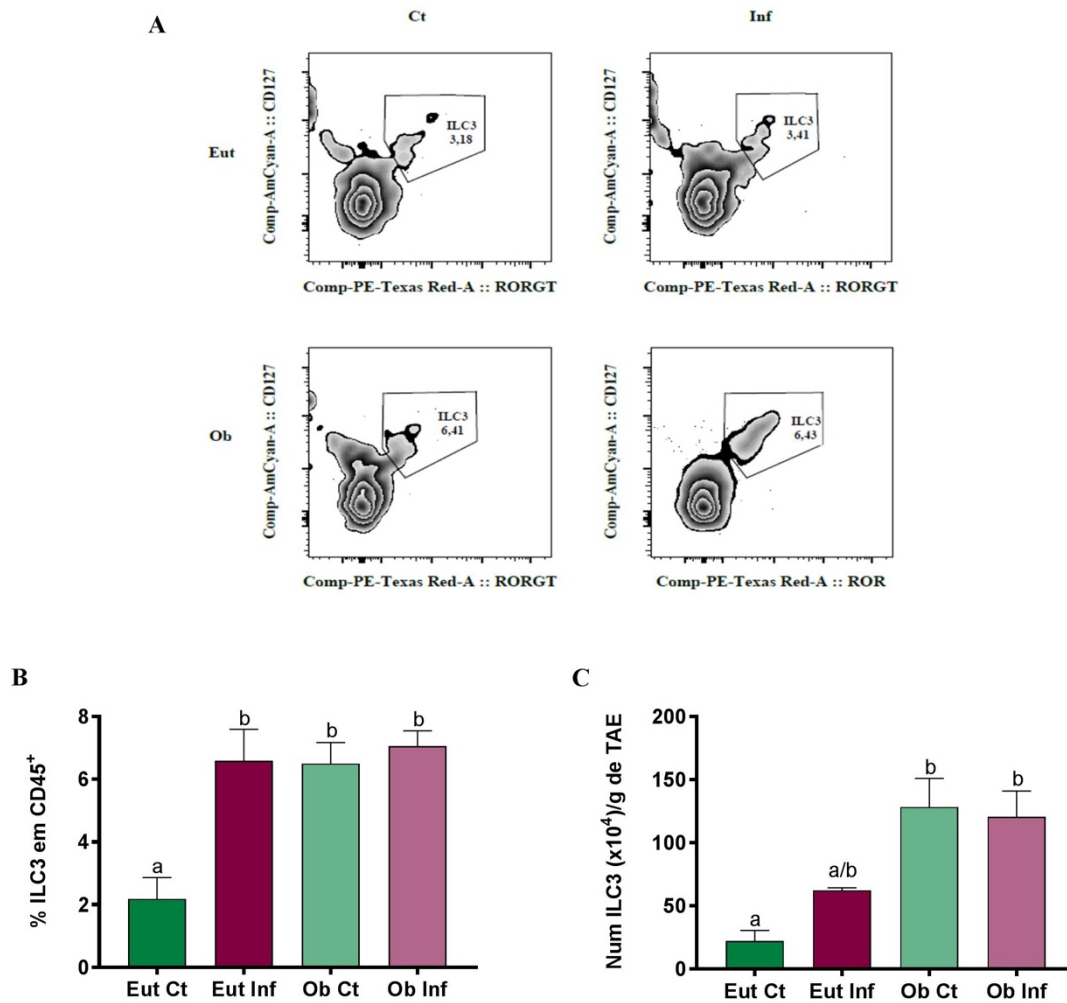


**Figura 26: Dieta hiperlipídica aumenta a migração de ILC1 para o tecido adiposo independente da infecção helmíntica.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de ILC1 ( $\text{Lin}^- \text{CD45}^+ \text{CD127}^+ \text{Tbet}^+$ ) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas ( $n=10$ ). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

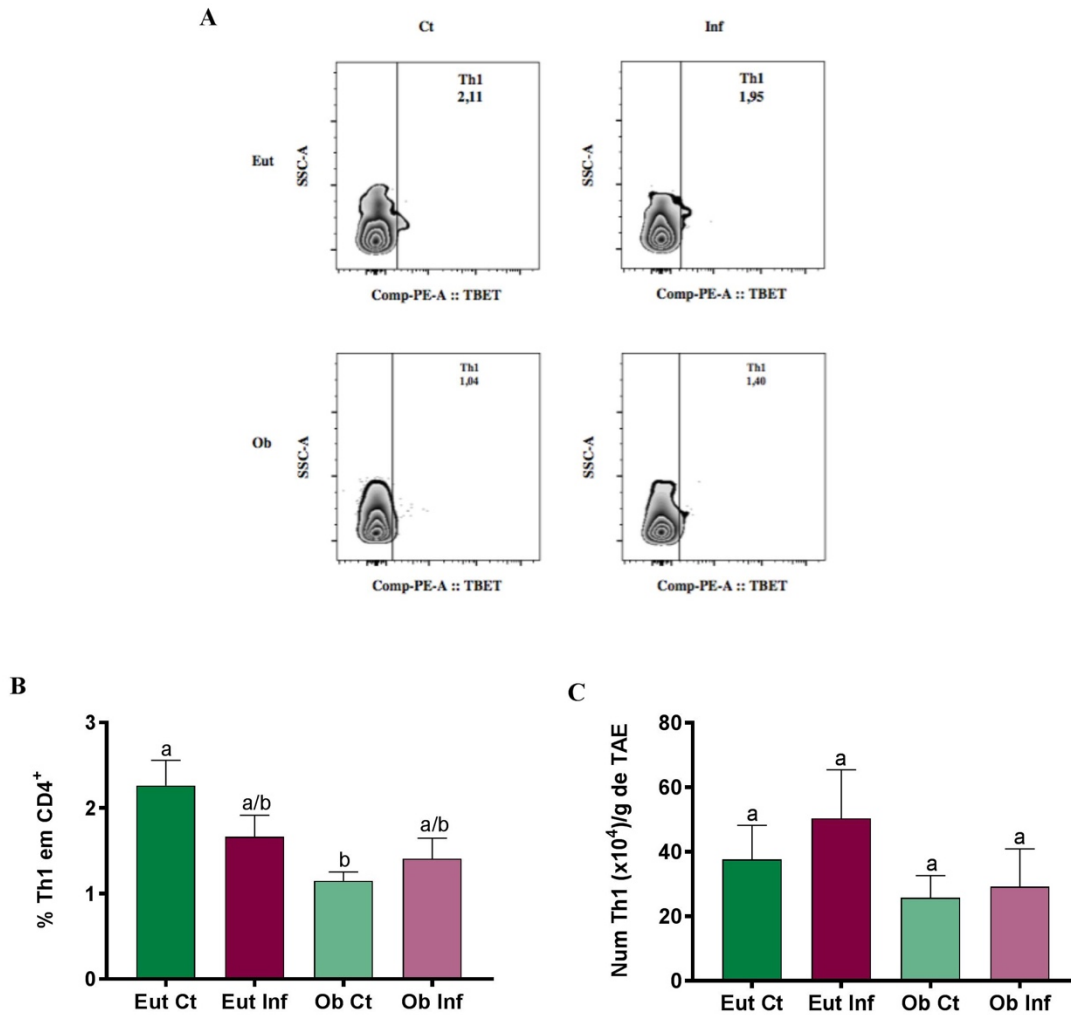


**Figura 27: Infecção helmíntica previne o aumento do número de ILC2 no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de ILC2 (Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .

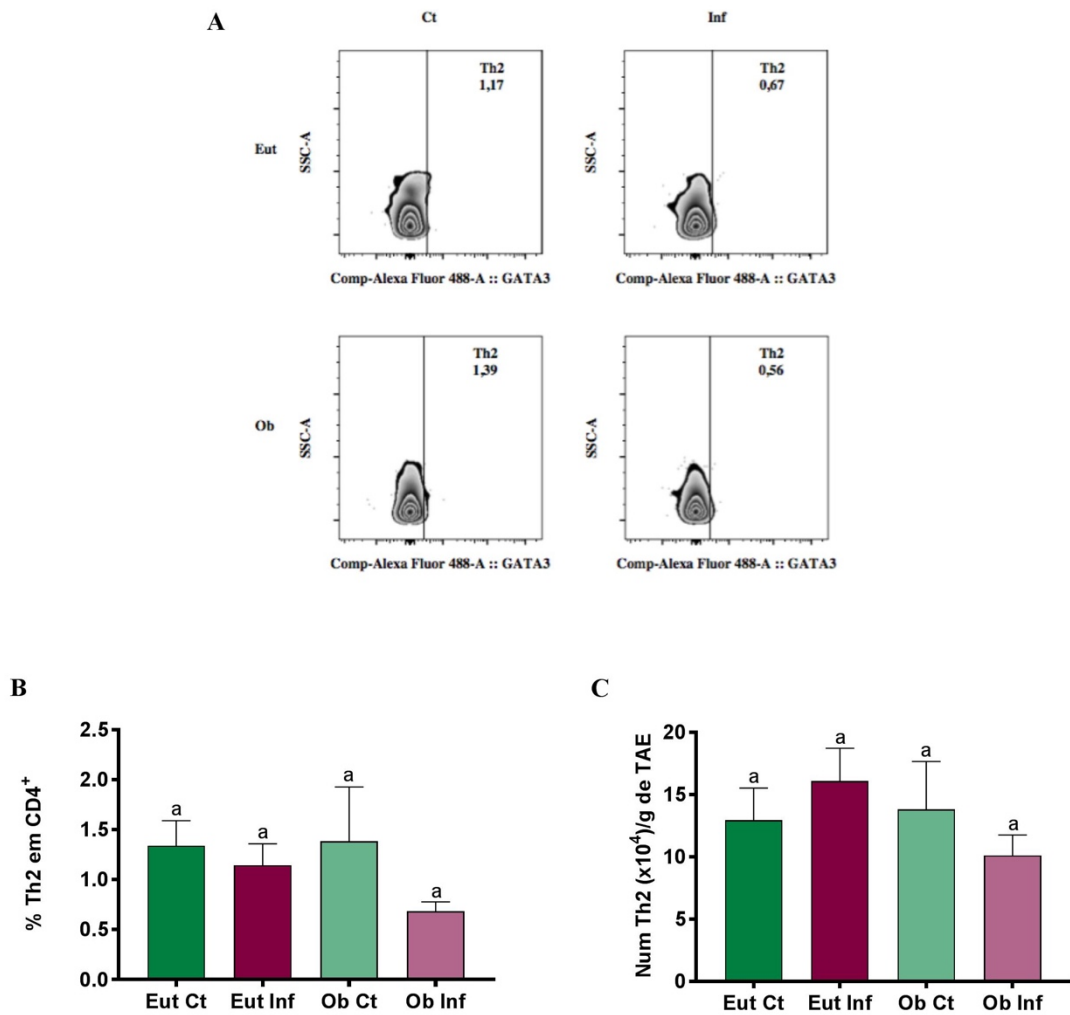




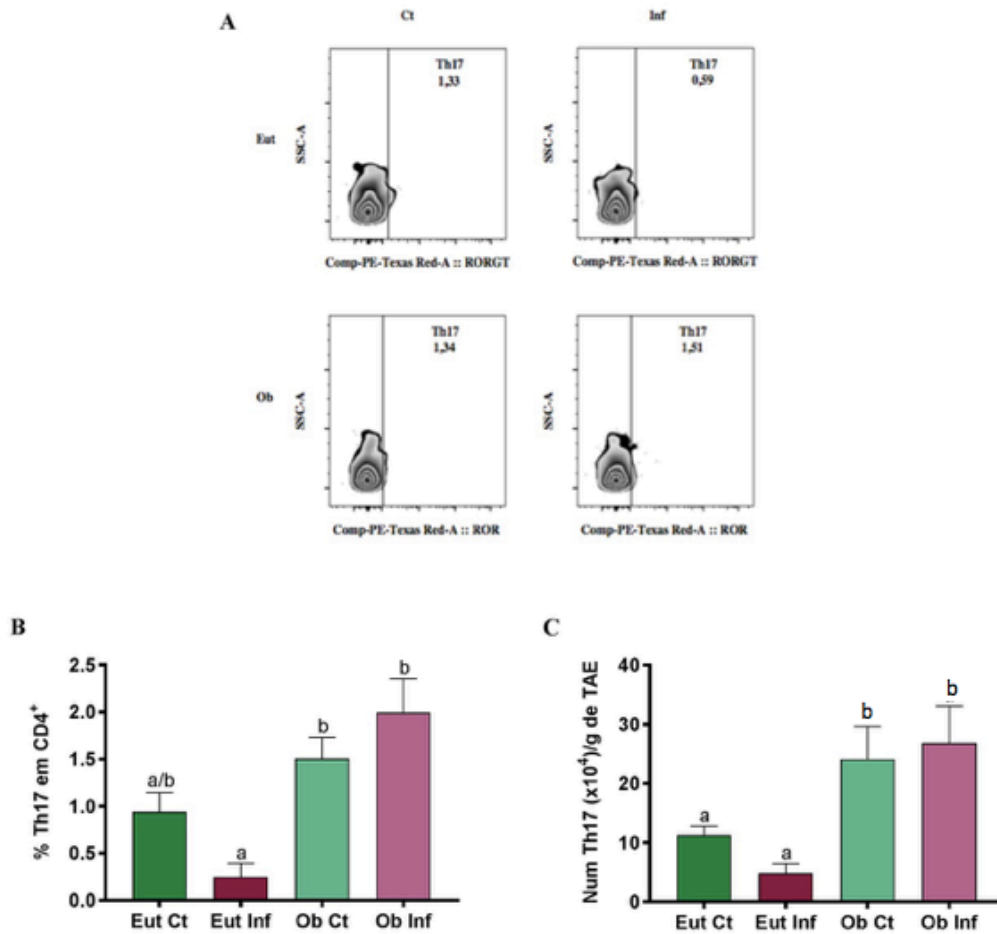
**Figura 28: População de ILC3 apresenta migração aumentada em todos os grupos de estudo quando comparados ao grupo não infectado submetido à dieta AIN-93M. Dot plots (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de ILC3 ( $Lin^-CD45^+CD127^+ROR\gamma t^+$ ) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes  $p < 0.05$ .**



**Figura 29: Dieta hiperlipídica diminui a migração de células Th1 para o tecido adiposo de animais não submetidos a infecção helmíntica.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de Th1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.



**Figura 30: Dieta hiperlipídica, associada ou não a infecção helmíntica, não altera a migração de células Th2 para o tecido adiposo. Dot plots (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de Th2 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. B e C One way ANOVA.**



**Figura 31: Dieta hiperlipídica aumenta a migração de células Th17 para o tecido adiposo independente da infecção helmíntica.** *Dot plots* (A), porcentagem (B) e número de células por grama de tecido adiposo epididimal (C) representativos da população de Th17 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>) nos quatro grupos de estudo em experimento de cinco semanas (n=10). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. B e C One way ANOVA. Letras diferentes p<0.05.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença inflamatória crônica associada ao desenvolvimento de alterações morfológicas (hipertrofia e hiperplasia) e metabólicas (síndrome metabólica) (Jo et al., 2009; Grundy, 1999; Grundy, 2004). Estas alterações são consequência tanto da desregulação na secreção de hormônios produzidos pelo tecido adiposo, as adipocinas, quanto pelo desenvolvimento de inflamação e estresse oxidativo (Cao, 2014; Gregor & Hotamisligil, 2011; Marseglia et al., 2015). A infecção helmíntica já foi utilizada como uma alternativa de controle destas desregulações desenvolvidas na obesidade, se mostrando benéfica em relação a redução de ganho de peso e impedimento de desenvolvimento de alterações metabólicas (Yang et al., 2013; Hussaarts et al., 2015; La Flame et al., 2007; Stanley et al., 2009; Chen et al., 2013). Neste contexto, o presente estudo demonstrou que a infecção, por *Heligmosomoides polygyrus*, foi capaz de reduzir o ganho de peso, o peso do tecido adiposo, epididimal e subcutâneo, e a hipertrofia dos adipócitos. Além disso impediu o desenvolvimento de resistência à insulina, diminuindo inclusive o nível sérico da glicose em jejum. Estas melhorias são, provavelmente consequência do impedimento tanto da desregulação na secreção de adipocinas, quanto do desenvolvimento da inflamação.

O efeito preventivo da infecção helmíntica no desenvolvimento de obesidade experimental constatado no presente estudo, corrobora com os resultados descritos previamente por Yang e cols (2013). Apesar dos animais que receberam dieta hiperlipídica apresentarem ingestão calórica similar, o ganho de peso dos animais infectados foi 15% menor quando comparado aos não infectados. Da mesma maneira, houve redução de cerca de 40% no peso do tecido adiposo epididimal e subcutâneo em animais do grupo Ob Inf. Esta diminuição do peso do tecido adiposo está relacionada com o menor ganho de peso nos Ob Inf, já que estudos que envolvem algum mecanismo de regulação de peso corporal, demonstram esta associação direta entre peso corporal e peso do tecido adiposo (Wu et al., 2011). Além disso, estas diferenças de peso não foram observadas entre os animais que consumiram dieta controle, demonstrando que a perda de peso dos Ob Inf não ocorreu devido a espoliação do parasita. Este efeito preventivo da presença do parasita no desenvolvimento da obesidade foi demonstrado também para humanos, a partir de um estudo realizado na Indonésia que associou a presença de parasitas transmitidos pelo solo,

como *Ascaris lumbricoides* e *Ancylostoma duodenale*, com menor índice de massa corporal (Wiria et al., 2013).

O presente estudo também validou o uso de *Heligmosomoides polygyrus* como modelo eficaz de infecção em estudos associados à obesidade, pois o parasita além de exercer efeito benéfico no desenvolvimento da doença, permaneceu no hospedeiro durante todo o período experimental sem necessidade de re-infecção. O uso deste parasita pode até mesmo substituir o modelo de infecção mais comum neste tipo de estudo, o *Nippostrongylus brasiliensis*, já que este necessita de re-infecções constantes durante o período experimental (Yang, 2013).

Estudos que envolvem infecção helmíntica e controle de peso são raros e alguns deles utilizam uma abordagem diferente (terapêutica) da utilizada no presente estudo, infectando animais já obesos. Dentre estes estudos terapêuticos é possível citar o realizado por Hussaarts e cols (2015), que utilizou machos de C57BL/6, com idade de aproximadamente 8 semanas, e infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni*, demonstrando redução no ganho de peso e no peso do tecido adiposo epididimal e subcutâneo nos animais infectados. Outro estudo envolvendo camundongos C57BL/6 e infecção por *Nippostrongylus brasiliensis*, também demonstrou diminuição de ganho de peso e do peso do tecido adiposo epididimal em animais infectados submetidos à dieta hiperlipídica, porém este efeito também foi constatado para os animais que receberam dieta controle (Yang et al., 2013).

Após constatar melhorias no ganho de peso, devido a presença da infecção, investigou-se o efeito do parasita no desenvolvimento de alterações morfológicas no tecido adiposo, como hipertrofia de adipócitos. Constatamos também, em estudo de caráter preventivo, o efeito benéfico da infecção em impedir o desenvolvimento exacerbado de hipertrofia. É bem estabelecido na literatura que o aumento no tamanho dos adipócitos corresponde a uma das principais causas do aumento da massa do tecido adiposo (Jo et al., 2009). Estudos com animais submetidos à dieta hiperlipídica demonstram que ao induzir algum mecanismo capaz de reduzir o ganho de peso, como aumento da lipólise intracelular, há redução no tamanho dos adipócitos associado a diminuição da massa do tecido adiposo visceral (Jeong & Yoon, 2009). É possível constatar então uma relação direta entre menor tamanho de adipócitos e menor massa do tecido adiposo, como ocorre no presente estudo.

Além de alterações morfológicas, a infecção foi capaz de impedir o desenvolvimento de alterações metabólicas, como resistência à insulina. A manutenção do correto funcionamento da insulina é de extrema importância para o metabolismo de glicose, pois o desenvolvimento de resistência a este hormônio corresponde ao primeiro passo para desregulação em todo este metabolismo (Wilcox, 2005). Esta resistência pode ser desenvolvida a partir de diversos fatores, como por exemplo a diminuição da expressão do receptor de insulina (Kahn et al., 1973). Neste contexto, o presente estudo demonstrou uma diminuição da expressão deste receptor nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, porém, apesar de não apresentar diferença estatística, a expressão deste receptor no tecido adiposo parece ser maior nos Ob Inf do que nos Ob Ct, mostrando uma tendência da infecção em restaurar a expressão deste gene. Além disso, neste estudo há evidências de reversão no desenvolvimento de resistência à insulina nos animais obesos infectados devido a melhor resposta, menor nível sérico de glicose, no teste de sensibilidade à insulina e tolerância a glicose, bem como menor nível de glicose em estado de jejum, corroborando novamente com os estudos de Yang e cols (2013) e Hussaarts e cols (2015).

Estas melhorias estão associadas a diversos fatores: a) primeiramente ao melhor controle de peso corporal, já que estes parâmetros de glicose estão diretamente relacionados ao índice de massa corporal (Siegel et al., 2008); b) melhora importante nos níveis de expressão de leptina e secreção de adiponectina, que também podem estar associadas a melhorias no metabolismo de glicose, pois ambas exercem efeito comprovado na manutenção do funcionamento da insulina (Szanto & Kahn, 2000; Berg et al., 2001). Yang e cols (2013) inclusive mostraram desregulação na secreção de leptina nos animais obesos não infectados, associando este fato a desregulações metabólicas, como maiores níveis séricos de glicose e insulina. Além disso, estudos envolvendo obesidade e regulação pela presença do parasita associam o aumento de eosinófilos e macrófagos M2 como outros responsáveis por melhorias metabólicas (Yang et al., 2013; Hussaarts et al., 2015).

O aumento de eosinófilos no tecido adiposo foi considerado benéfico, pois esta célula pode ser grande produtora de IL-4 no tecido adiposo, sendo esta citocina a principal responsável pela indução de macrófagos M2, que estão associados a manutenção da homeostase metabólica (Wu et al., 2011). No presente estudo foi possível observar aumento

na porcentagem de eosinófilos no tecido adiposo de animais infectados, demonstrando outro potencial mecanismo responsável pelas melhoras metabólicas. Apesar disso, como não foi avaliada a expressão de citocinas como IL-4, nem a marcação de macrófagos M2, não foi possível demonstrar de maneira mais direta a ação dos eosinófilos nestas melhorias.

Em relação aos macrófagos M2, estudos envolvendo infecção helmíntica e síndrome metabólica demonstram que além dos efeitos benéficos destas células no metabolismo de glicose, elas também exercem influência no colesterol, diminuindo o nível de colesterol total e LDL e aumentando o nível de HDL (La Flamme et al., 2007; Stanley et al., 2009). O presente estudo constatou aumento no nível sérico de colesterol HDL nos animais Ob Inf, o que possivelmente refletiu no aumento do nível de colesterol total constatado. Stanley (2009), demonstrou que até o vigésimo sétimo dia após a infecção por *Schistosoma mansoni*, há aumento no colesterol total, que só tende a diminuir após este dia. O efeito exercido por *Heligmosomoides polygyrus*, no colesterol, pode ser similar ao de *Schistosoma mansoni*, sendo necessário avaliar este parâmetro em experimento mais duradouro. Além disso, a melhoria observada no colesterol HDL reforça a necessidade de realização de novos experimentos para elucidar o comportamento de macrófagos M2, e aferir a influência dos mesmos nestes benefícios.

A diferenciação de células Th2 também é considerada uma das principais responsáveis pelos efeitos benéficos observados em estudos de obesidade, como diminuição do peso corporal e hipertrofia, e impedimento de desregulações metabólicas (Winer et al., 2009a; Hussaarts et al., 2015). As células Th2 agem diminuindo a expansão de células Th1, impedindo consequentemente a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , diminuindo assim a inflamação, o que auxilia na homeostase metabólica (Winer et al., 2009a). No presente estudo, apesar de haver diminuição de células Th1 nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, não foi possível observar aumento nas células Th2, sugerindo que as melhoras observadas são independentes deste tipo celular. Além disso, apesar da diminuição de Th1, há aumento de Th17 nestes animais, sugerindo que estas células correspondem a principal fonte de inflamação em resposta à dieta hiperlipídica (Winer et al., 2009b).



Ainda considerando as células  $CD4^+$ , a população de células Treg também está associada a manutenção da homeostase metabólica, estando presente em abundância no tecido adiposo de indivíduos saudáveis e se encontrando diminuída na obesidade (Feuerer et al., 2009). O ambiente inflamatório estabelecido no tecido adiposo durante a obesidade não é favorável para as células Tregs, que tendem a sair do tecido nestas condições (Feuerer et al., 2009). Além disso, há uma associação entre adipocinas e Tregs, sendo que quando há desregulação nas adipocinas, como ocorre na obesidade, há consequentemente diminuição na proliferação destas células. As células Treg agem diretamente no controle da inflamação, levando consequentemente a melhorias metabólicas (Feuerer et al., 2009). No presente estudo foi possível observar maior porcentagem e número de células Tregs no grupo Ob Inf quando comparado ao Ob Ct e também uma menor inflamação no primeiro grupo, demonstrada através da redução na expressão de uma das principais citocinas pró-inflamatórias, o  $TNF-\alpha$  (Ilan et al., 2010). Esta diminuição da inflamação parece ocorrer devido a mecanismos independentes da produção de IL-10, já que a expressão desta citocina não foi alterada de acordo com quantidade de células Tregs. O aumento da regulação via células  $FoxP3^+$  sem o aumento de IL-10 já foi encontrada em estudos utilizando pacientes obesos que não desenvolvem síndrome metabólica (Pereira et al., 2014). Além disso, estudos envolvendo obesidade sugerem que macrófagos M2 tendem ser a principal fonte de IL-10 no tecido adiposo (Feuerer et al., 2009). No presente estudo não observamos alterações nem na população de macrófagos nem nesta citocina, e assim acreditamos que a regulação da inflamação no grupo Ob Inf provém de outro mecanismo induzido por células Tregs, que deve ser investigado em estudos futuros.

As análises de citometria demonstraram aumento de migração de diversas células inflamatórias (ILC1, ILC3 e Th17) em ambos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica. Apesar da presença destas células no tecido adiposo dos animais infectados a ação das mesmas parece estar sendo inibida, já que estes animais não desenvolvem as mesmas alterações, morfológicas e metabólicas, que os não infectados. Esta inibição pode ser proveniente das células Tregs, que não se encontram diminuídas neste grupo, provavelmente devido a melhor regulação das adipocinas (Feuerer et al., 2009).

Além da diminuição na expressão de TNF- $\alpha$ , a baixa migração de monócitos para o tecido adiposo dos Ob Inf pode corresponder a outro indicador de redução da inflamação. A grande maioria dos estudos apontam macrófagos, principalmente M1, como uma das principais células produtoras de citocinas pró-inflamatórias durante a obesidade (Sumuri & Hasty, 2008). Porém estudos recentes como o de Krinninger e cols (2014), demonstram também um papel importante dos monócitos na inflamação estabelecida na obesidade. Krinninger (2014) demonstrou que há aumento de monócitos na circulação de indivíduos obesos e que estas células estão em um estado pró-inflamatório ativado, tendendo a migrar para o tecido em resposta a sinais quimiotáticos. Segundo este estudo há ainda uma relação entre a diminuição de adiponectina e o aumento da indução do fenótipo pró-inflamatório dos monócitos. No presente estudo foi possível perceber uma diminuição na secreção de adiponectina, pelos adipócitos, nos animais Ob Ct, o que pode ter acarretado em uma maior ativação de monócitos pró-inflamatórios, aumentando a concentração dos mesmos no tecido adiposo, resultando em um aumento da inflamação. Esta cascata inflamatória não foi observada nos animais Ob Inf, já que neles não há desregulação na secreção de adiponectina, e conseqüentemente não foi observado aumento dos monócitos no tecido.

O presente estudo também demonstrou aumento na porcentagem de ILC2 em ambos os grupos submetidos a dieta hiperlipídica. Considerando o papel descrito na literatura, estas células ao se apresentarem aumentadas em ambos os grupos Ob parecem estar exercendo papéis distintos em cada um dos grupos. Estudos envolvendo inflamações das vias aéreas (asma) demonstram que a produção de IL-5 e IL-13 pelas ILC2 contribuem para a patologia desta doença (Mathews et al., 2014; Everaere et al., 2015). Em contrapartida, Molofsky (2013) demonstrou que a IL-5 e IL-13 produzidas pelas ILC2 no tecido adiposo são as principais responsáveis pela acumulação de eosinófilos e macrófagos M2 no tecido, sendo essenciais para a manutenção da homeostase metabólica. Embora possamos observar o aumento de ILC2 em ambos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica, nos animais não infectados o aumento de ILC2 parece ser irrelevante tanto no ganho de peso quanto no desenvolvimento de síndrome metabólica provavelmente devido a outros mecanismos pró-inflamatórios estarem mais atuantes nesses animais. No entanto, nos animais infectados o aumento de ILC2 se associa com efeitos benéficos, inclusive podendo ser observado pela elevada porcentagem de eosinófilos mantidos no tecido adiposo destes animais.

Por fim, o presente estudo demonstrou que apesar de manter os mecanismos antioxidantes inalterados a infecção não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo induzido pela dieta hiperlipídica, já que não houve redução na concentração de MDA no grupo Ob Inf comparado ao Ob Ct. No entanto, apesar do ensaio de TBARS ser amplamente utilizado, ele tem sido criticado por ser inespecífico (Block et al., 2002). O ácido tiobarbitúrico, utilizado neste ensaio, é capaz de reagir com diversas substâncias derivadas da peroxidação lipídica, não apenas o MDA. Além disso os métodos comuns de detecção do MDA, espectrofotometria e fluorescência, não são suficientemente sensitivos. Desta forma para determinação mais específica de estresse oxidativo é necessário utilizar um método mais sensível na detecção do MDA (cromatografia), e também associar a concentração de MDA com a de outros compostos, como o 4-Hydroxynonenal (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>) (Grotto et al., 2009).

Tomados em conjunto, os resultados encontrados pelo presente estudo demonstram os efeitos benéficos da infecção helmíntica no desenvolvimento da obesidade e de suas consequências metabólicas. Estes efeitos benéficos são consequência de alterações do infiltrado celular no tecido adiposo, incluindo principalmente o aumento de eosinófilos e células Tregs, que acabam diminuindo a inflamação, impedindo consequentemente desregulações no metabolismo. No entanto, ainda há resultados controversos, como o desenvolvimento de estresse oxidativo, e também parâmetros não analisados, como o papel de macrófagos M2, sendo necessários estudos posteriores para investigação dos mesmos.

## 6 CONCLUSÃO

A infecção por *Heligmosomoides polygyrus* previne o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Tais efeitos estão associados com o aumento de eosinófilos e células T reguladoras, que acabam por migrar para o tecido adiposo acompanhando a migração de células inflamatórias (Th17, ILC1 e ILC3) estimulada pela dieta hiperlipídica. A presença das células reguladoras bloqueia a função inflamatória destas células migrantes para o tecido, diminuindo a inflamação (diminui TNF- $\alpha$ ) em um mecanismo independente de IL-10. Acreditamos que a prevenção do processo inflamatório impeça o ganho exacerbado de peso, e o desenvolvimento de alterações metabólicas, como resistência à insulina. A manutenção das condições normais do organismo impede a desregulação das adipocinas, que: reforçam o impedimento do desenvolvimento de alterações metabólicas, mantêm o número alto de células T reguladoras no tecido adiposo e previnem a ativação e migração de monócitos inflamatórios para o tecido adiposo.

Em resumo, a presença do helminto, *Heligosomoides polygyrus*, induz a proliferação de células, eosinófilos e Treg, em resposta a presença do mesmo, que acabam consequentemente exercendo efeito negativo no desenvolvimento da obesidade e de suas consequências metabólicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 1984;105:121-126.

Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. J Clin Biochem Nutr. 2008;42:150-157.

Allain CC, Poon LS, Cicely SG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. Clin Chem. 1974;20(4):470-475.

Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Rev Immunol. 2011;11:375-388.

Aravindhavan V, Mohan V, Surendar J, Rao MM, Pavankumar N, Deepa M, et al. Decreased Prevalence of Lymphatic Filariasis among Diabetic Subjects Associated with a Diminished Pro-Inflammatory Cytokine Response (CURES 83). PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(6) e707.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257(1):79-83.

Babu S, Bhat SQ, Kumar NP, Lipira AB, Kumar S, Karthik C, et al. Filariasis Lymphedema Is Characterized by Antigen-Specific Th1 and Th17 Proinflammatory Responses and a Lack of Regulatory T Cells. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4):e420.

Bahia L, Coutinho ESF, Barufaldi LA, Abreu GA, Malhão TA, Souza CPR, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health* 2012;12:440.

Bahia LR, Araújo, DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2014;13(1) – Obesidade.

Bansemir AD, Sukhdeo MV. The food resource of adult *Heligmosomoides polygyrus* in the small intestine. *J Parasitol*.1994;80(1):24-28.

Bashir MEH, Andersen P, Fuss IJ, Shi HN, Nagler-Anderson C. An Enteric Helminth Infection Protects Against an Allergic Response to Dietary Antigen *J Immunol*. 2002;169 (6):3284-3292.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 2001;8(7):947-953.

Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. *Am J Epidemiol*. 2002;156(3):274-285.

Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012;68 (4):701-711.

Bordes F, Morand S. Coevolution between multiple helminth infestations and basal immune investment in mammals: cumulative effects of polyparasitism? *Parasitol Res*. 2009;106:33-37.

Brasil. Mais da metade dos adultos está acima do peso. Atualizado em Agosto, 2015. Site Portal do Brasil. <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/08/mais-da-metade-dos-adultos-estao-acima-do-peso>.

Camberis M, Le Gros G, Urban Jr J. Animal Model of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Heligmosomoides polygyrus*. Current protocols in Immunology 2003; Supplement 55: 19.12.1-19.12.27.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. Science. 1995; 269:546-549.

Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. J Endocrinol. 2014;220(2):47-49.

Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. J Bio. Chem. 2001;276(46):42728-42736.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone? Diabetes Care. 2003;26(8):2442–2450.

Chen Y, Lu J, Huang Y, Wang T, Xu Y, Xu M, et al. Association of previous schistosome infection with diabetes and metabolic syndrome: a cross-sectional study in rural China. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(2):E283-E287.

Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. Ann Neurol. 2008;64(2):187-199.

Cox FEG. History of Human Parasitology. Clin Microbiol Rev. 2002;15(4):595-612.

Dieterich S, Bieligk U, Hasenfuss G, Prestle J. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. Circulation. 2000;101(1):33-39.

Dobson C, Owen ME. Effect of host sex on passive immunity in mice infected with *Nematospiroides dubius*. Int J Parasitol. 1978;8(5):359-364.

Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. Parasitology. 2002;125(Pt 5):415-421.

Dolo H, Coulibaly YI, Dembele B, Konate S, Coulibaly S, Doumbia SS, et al. Filariasis Attenuates Anemia and Proinflammatory Responses Associated with Clinical Malaria: A Matched Prospective Study in Children and Young Adults. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(11):e1890.

EASO – European Association for Study of Obesity. Obesity Facts & Figures: World Health Organisation. Fact sheet n°311. 2013.

Ehrenford FA. The Life Cycle of *Nematospiroides dubius* Baylis (Nematoda: Heligmosomidae). J Parasitol. 1954;40(4):40-481.



Elliott DE, Setiawan T, Metwali A, Blum A, Urban JF Jr, Weinstock JV. *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice. *Eur J Immunol.* 2004;34 (10): 2690-2698.

Everaere L, Yahia SA, Molendi-Coste O, Vorng H, Flueury S, Bouchaert E, et al. ILC2 and ILC3 contribute to house dust mite (HDM)-induced asthma in obese mice. *Revue des Maladies Respiratoires (Communications orales)* 2015;32(3):305.

Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol.* 2010;40(6):1525-1537.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology.* 2010;51:679-689.

Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: Epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol.* 2009;114(1): 121-127.

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15(8):930-939.

Flier JS. The Adipocyte: Storage Depot or Node on the Energy Information Superhighway? *Cell.* 1995;85:15-18.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J pediatr (Rio J)*. 2007;83(5 Suppl):S192-203.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin activation. *Nature Medicine*. 1995;12(1):1311-1314.

Freedland SJ, Platz EA. Obesity and Prostate Cancer: Making Sense out of Apparently Conflicting Data. *Epidemiol Rev*. 2007;29:88-97.

Frezza EE, Waschtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*. 2006;55:285-291.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1752-1761.

Girgis NM, Gundra UM, Loke P. Immune Regulation during Helminth Infections. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003250.

Greenwood BM, Cantab MB. Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. *The Lancet*. 1968;292(7564):380-382.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-445.

Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*. 2009;32(1):169-174.

Grundy SM. Hypertriglyceridemia, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome. *Am J Cardiol*. 1999;83: 25F-29F.

Grundy SM. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2595-2600.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:8878-8883.

Hammond RA, Levine R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes Target Ther*. 2010;3:285-295.

Hang L, Setiawan T, Blum AM, Urban J, Stoyanoff K, Arihiro S, et al. *Heligmosomoides polygyrus* infection can inhibit colitis through direct interaction with innate immunity. *J Immunol*. 2010;185(6):3184-3189.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Human Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-2415.

Hotez PJ, Brindley PJ, Benthony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1311-1321.

Hussaarts L, van der Vlugt LE, Yazdanbakhsh M, Smits HH. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(4):733-739.

Hussaarts L, García-Tardón N, van Beek L, Heemskerk MM, Haeberlein S, van der Zon GC, et al. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J.* 2015;29:3027-3039.

Ilan Y, Maron R, Tukpah AM, Maioli TU, Murugaiyan G, Yang K, et al. Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *PNAS.* 2010;107(21):9765-9770.

Jeong S, Yoon M. Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPAR $\alpha$  in high fat diet-induced obese mice. *Exp Mol Med.* 2009;41(6):397-405.

Jo J, Gravrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(3):e1000324.

Kahn CR, Jr. Neville DM, Roth J. Insulin-Receptor Interaction in the Obese-Hyperglycemic mouse: a model of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1973;248:244-250.

Kershaw EE, Flier JF. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocr Metab.* 2004;89(6):2548-2556.

Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, et al. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2500-2509.

La Flamme AC, Harvie M, Kenwright D, Cameron K, Rawlwnce N, Low YS, et al. Chronic exposure to schistosome eggs reduces serum cholesterol but has no effect on atherosclerotic lesion development. *Parasite Immunol.* 2007;29(5):259-266.

Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer.* 2007a;97(7):1005-1008.

Larsson SC, Wolk A. Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2007b;96:1457-1461.

Lawrence CE. The immunobiology of *Heligmosomoides polygyrus* in the murine host. Tese PhD, Universidade de Nottingham, 1990.

Layland LE, Straubinger K, Ritter M, Loffredo-Verde E, Garn H, Sparwasser T, Costa CP. *Schistosoma mansoni*-Mediated Suppression of Allergic Airway Inflammation Requires Patency and Foxp3<sup>+</sup> Treg Cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2379.

Lean M. Clinical Handbook of weight management. Marin Dunitz, Londres 1998.

Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2009;302(2):179-188.

Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clément K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009;15(8): 940-945.

Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem*. 1977;23(5):882-884.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007a;117(1):175-184.

Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007b;56(1): 16-23.

Maeda N, Shimomura I, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002;8(7):731-737.

Maizels RM, Hewitson JP, Murray J, Harcus YM, Dayer B, Filbey KJ, et al. Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Exp Parasitol*. 2012;132(1):76-89.

Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(3):666-675.

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16:378-400.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451-483.

Mathews J, Wurmbrand A, Umetsu D, Shore S. ILC2 contribute to ozone-induced airway hyperresponsiveness in obese mice. *J Immunol*. 2014;192(1):118.11.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244:6049-6055.

McMillin JM. *Clinical Methods: The History, Physical and Laboratory Examinations*. Terceira edição. 1990; Capítulo 141: 662-665.

McSorley HJ, Maizels RM. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):585-608.

Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF, Vasan RS, Benjamin EJ. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2007;30(10):2529-2535.

Metenou S, Nutman TB. Regulatory T Cell Subsets in Filarial Infection and Their Function. *Front Immunol.* 2013;4:305.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001. *JAMA.* 2003;289(1):76-79.

Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, Dyken SJV, Cheng LE, Mohapatra A, et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *JEM.* 2013;210(3):535-549.

Monroy FG, Enriquez FJ. *Heligmosomoides polygyrus*: a model for chronic gastrointestinal helminthiasis. *Parasitol Today.* 1992;8(2):49-54.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.* 2014;384(9945):766-781.

NIH - National Health Institute. What Causes Overweight and Obesity? Updated July 2012. NIH web site. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/obe/causes>.

NIH - National Health Institute. What is Metabolic Syndrom? Updated June 2016. NIH web site. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/ms#>.



Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009;15(8):914-920.

Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, et al. Natural Killer Cells Are Involved in Adipose Tissue Inflammation and Glucose Intolerance in Diet-Induced Obese Mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):193-199.

Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S, Kolaheerloo F, Webb PM. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2007;43(4):690-709.

O'Sullivan TE, Rapp M, Bhardawaj P, Fan X, Dannenberg A, Sun JCY. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity.* 2016;45:1-14.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakashi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306: 457-461.

Pan SY, DesMeules M, Morrison H, Wen SW. Obesity, High Energy Intake, Lack of Physical Activity, and the Risk of Kidney Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(12):2453-2460.

Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *J Obes.* 2013;2013(6161193):1-9.

Pelleymounter MA, Cullen JM, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the *obese* Gene Product on Body Weight Regulation in *ob/ob* Mice. *Science* 1995;269:540-543.

Penttila IA, Ey PL, Jenkin CR. Infection of mice with *Nematospiroides dubius*: demonstration of neutrophil-mediated immunity in vivo in the presence of antibodies. *Immunology* 1984;53(1):147-154.

Pereira S, Teixeira L, Aguilar E, Oliveira M, Savassi-Rocha A, Pelaez JN, et al. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3<sup>+</sup> Treg cells, IL-10, and TGF- $\beta$  in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition*. 2014;30:784-790.

Price P. Depression of humoral responses by murine cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol*. 1990;68:33-43.

Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):S64-S73.

Redon J. Hypertension in obesity. *NMCD*. 2001; 11(5):344-353.

Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells: I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*. 1964;239(2):375-380.

Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome. *Circ J*. 2004;68:975-981.

Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto IC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RAS. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008;57(2):340-347.

Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol*. 2005;174(8):4718-4726.

Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. 2010;327(5963):296-300.

Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1370-R1375.

Siegel D, Meier J, Maas C, Lopez J, Swislocki AL. The effect of body mass index on fasting blood glucose after initiation of thiazide therapy in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008;21(4):438-442.

Smith P, Mangan NE, Walsh CM, Fallon RE, McKenzie AN, van Rooijen N, Fallon PG. Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. *J Immunol*. 2007;178 (7):4557-4566.

Smith AD, Cheung L, Beshah E, Shea-Donohue T, Urban Jr JF. Selenium Status Alters the Immune Response and Expulsion of Adult *Heligmosomoides bakeri* Worms in Mice. *Infect Immun*. 2013;81(7):2546-2553.

Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010;24(8):2596-2611.

Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2006;346(3):739-745.

Sørensen TI, Echwald SM, Holm JC. Leptin in Obesity. *BMJ.* 1996;313:953-954.

Stanley RG, Jackson CL, Griffiths K, Doenhoff MJ. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice. *Atherosclerosis.* 2009;207(1):131-138.

Stephenson GD, Rose DP. Breast Cancer and Obesity: An Update. *Nutr Cancer.* 2009;45(1):1-16.

Surmi BK, Hasty A. Macrophage infiltration into adipose tissue. *Future Lipidol* 2008;3(5):545-556.

Sutton TL, Zhao A, Madden KB, Elfrey JE, Tuft BA, Sullivan CA, et al. Anti-Inflammatory mechanisms of enteric *Heligmosomoides polygyrus* infection against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in a murine model. *Infect Immun.* 2008;76(10):4772-4782.

Szanto I, Kahn R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *PNAS.* 2000;97(5):2355-2360.

Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJC, John S, Taams LS. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. PNAS. 2007;104(49):19446-19451.

Valdecantos MP, Pérez-Mature P, Martínez JA. Obesity and role of antioxidant supplementation. Rev Invest Clin. 2009;61(2):127-139.

VIGITEL Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e Distrito Federal em 2014. Brasília: Ministério da Saúde, Brasil 2015.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Int J Obes. 2006;30(3):400-418.

Wallin B, Rosengreen B, Schertzer HG, Camejo G. Lipoprotein Oxidation and Measurement of Thiobarbituric Acid Reacting Substances Formation in a Single Microtiter Plate: Its Use for Evaluation of Antioxidants. Analytical Biochemistry. 1993;208:10-15.

Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L. Overfeeding Rapidly Induces Leptin and Insulin Resistance. Diabetes. 2001;50(12):2786-2791.

WHO - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation. WHO Technical Report Series 894. 2000.

WHO - World Health Organization. Global Status Report on noncommunicable diseases 2014. p. 79-93.

WHO – World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet. Updated June, 2016. WHO web site. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26:19-39.

Wilson MS, Maizels RM. Regulation of Allergy and Autoimmunity in Helminth Infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2004;26:35-50.

Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CAM, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005;202(9):1199-1212.

Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009a;15(8):921-930.

Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, Winer D, et al. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol.* 2009b;39:2629-2635.

Winer DA, Winer S, Chng MHY, Shen L, Engleman EG. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:1033.

Wiria AE, Wammes LJ, Hamid F, Dekkers OM, Prasetyani MA, May L, et al. Relationship between Carotid Intima Media Thickness and Helminth Infections on Flores Island, Indonesia. PLoS ONE. 2013;8(1):e54855.

Wong C, Marwick T. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. Nat Rev Cardiol. 2007;4:436-443.

Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. Science. 2011;332(6026):243-247.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang Daseng, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest. 2003;112(12):1821-1830.

Yang Z, Grinchuk V, Smith A, Qin B, Bohl JA, Notari L, Zhang Z, Sesaki H, Urban Jr. JF, Shea-Donohue T, Zhao A. Parasitic Nematode-Induced Modulation of Body Weight and Associated Metabolic Dysfunction in Mouse Models of Obesity. Infection and Immunity. 2013;81(6):1905-1914.

Zacccone P, burton O, Miller N, Jones FM, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. Eur J Immunol. 2009;39(4):1098-1107.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barrone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. Nature. 1994;374:425-432.

Zou C, Shao J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. *J Nutr Biochem.* 2008;19:277-286.





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

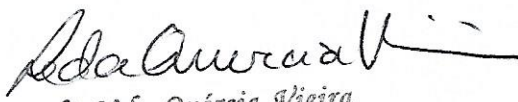


**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAMILA PEREIRA DE QUEIROZ.** Aos treze dias do mês de fevereiro de 2017 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Infecção helmíntica exerce efeito benéfico no desenvolvimento da obesidade experimental e suas consequências metabólicas", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Dirce Ribeiro de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de fevereiro de 2017.

  
 Dra. Dirce Ribeiro de Oliveira (UFMG)

  
 Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

  
 Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

  
 Prof. Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG